



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA
&

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA LA FE - CIBERCV

ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO DEL COLÁGENO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA. IMPLICACIONES EN EL REMODELADO VENTRICULAR.

TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR:

CAROLINA GIL CAYUELA

DIRIGIDA POR:

Jose Miguel Rivera Otero
Manuel Portolés Sanz
Esther Roselló Lletí

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2018

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Departament de Biotecnologia
&
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES –CIBERCV–
en consorcio con
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE
Grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco

**“ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO
DEL COLÁGENO EN LA INSUFICIENCIA
CARDIACA. IMPLICACIONES EN EL
REMODELADO VENTRICULAR.”**

Memoria para optar al grado de Doctora en Biotecnología, presentada
por:

CAROLINA GIL CAYUELA

Y dirigida por:

Dr. Jose Miguel Rivera Otero
Dr. Manuel Portolés Sanz
Dra. Esther Roselló Lletí

Valencia, 22 de septiembre de 2018

Hospital Universitari i Politècnic La Fe
CIBERCV e Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
Valencia

D. J. MIGUEL RIVERA OTERO, Investigador Principal del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia,

D. MANUEL PORTOLÉS SANZ, Facultativo Especialista del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia y

Dña. ESTHER ROSELLÓ LLETÍ, Investigadora Doctora del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Dña. CAROLINA GIL CAYUELA**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, en el grupo acreditado de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de: “ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO DEL COLÁGENO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA. IMPLICACIONES EN EL REMODELADO VENTRICULAR”.

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 22 de Septiembre de 2018

Fdo. Dr. J. Miguel
Rivera Otero

Fdo. Dr. Manuel
Portolés Sanz

Fdo. Dra. Esther
Roselló Lletí

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- “Cinética del transporte núcleo-citoplasmático de los cardiomiocitos humanos en la insuficiencia cardiaca. Análisis celular y de expresión génica”. PI-10/00275, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Alteraciones moleculares y estructurales en la insuficiencia cardiaca”. RD12/0042/0003, Red de Investigación Cardiovascular (RIC), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Transporte núcleo-citoplasma y cambios de expresión génica en la insuficiencia cardiaca. Puesta en marcha de una nueva estrategia terapéutica”. PI-13/00100, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Seguimiento de pacientes sometidos a trasplante cardiaco. Estudio de marcadores de rechazo implicados en el transporte núcleo-citoplasma”. PI-14/01506, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dra. Esther Roselló Lletí.
- “Daño miocárdico y sus consecuencias. Identificación de nuevos biomarcadores en insuficiencia cardiaca”. CB16/11/00261, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III. IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

A mis seres queridos

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes y sus familiares que hacen posible nuestro trabajo. Gracias por creer en la ciencia y en los investigadores, por vuestra participación y consentimiento y vuestro espíritu de lucha. A Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe por estar siempre al pie del cañón y tenernos tan presentes.

A mis directores, gracias por haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación con sus luces y sus sombras, por curtirme en el campo de batalla de la ciencia, por enseñarme a ser positiva y a ver las cosas con perspectiva.

A mi tutor, Dr. Rafael Sirera, por su apoyo y comprensión, por resolver mis numerosas dudas, especialmente administrativas, y por estar pendiente de mi trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, por haberme hecho sentir una más haciendo el trabajo del día a día más fácil, por esas charlas matinales, por estar en los malos momentos y por contar conmigo.

A mis colegas, por esas salidas y fiestas interminables que ayudan tanto a desconectar.

A mis celadoras favoritas, por recibirme siempre con una sonrisa, por vuestro interés en mi trabajo y vuestro apoyo moral y aliento cuando los días de trabajo no parecían acabar nunca.

A l@s compañer@s del sótano, por prestarme su ayuda incondicional cuando no me conocían de nada y resolver mis dudas técnicas.

A mis chic@s de la limpieza y residuos, por esas conversaciones en los pasillos y por darme ánimos cuando estábamos solas en el edificio.

Al laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra por vuestra acogida, por vuestro ejemplo de profesionalidad y compañerismo.

A mis vecinas de Morillas, por nuestros encuentros secretos, por vuestra complicidad y apoyo, por haber sido mi flotador en los momentos de marea alta y por dar esa nota de humor tan necesaria.

A los Ángeles de Quintana, que a pesar de habernos conocido en esta última etapa habéis sido un soplo de aire fresco. Por las risas y anécdotas compartidas, ahora ya sabemos que ocurre cuando se juntan un par de coca-colas y unas cajoneras.

A mis profesores, aquellos que han sido capaces de hacer cada clase emocionante, que han conseguido contagiarme con sus inquietudes, motivarme y me han ayudado a creer en mí.

A mis amigos, por su sentido del humor y divertidos puntos de vista, por ayudarme a relativizar las cosas, por las noches de juegos y cenas compartidas, por verlo todo tan claro y por esas situaciones desternillantes junto a los morados.

A mi psicóloga particular, porque sin decirnos nada nos contamos todo, por sentirme libre cuando hablo contigo, por tantos momentos inolvidables que nos ha dado nuestro programa de radio y nuestra selección de “Ella Baila Sola”.

A mi familia, por hacerme sentir la persona más afortunada del mundo cada vez que pienso en vosotros. Por ser mi refugio y felicidad, mi fuente de inspiración y mi oasis cuando me siento perdida en el desierto. Gracias por absolutamente todo.

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de
vida de todo progreso”

Louis Pasteur

“Los tres grandes elementos esenciales para lograr cualquier cosa que
valga la pena son: el trabajo, la perseverancia y el sentido común”

Thomas A. Edison

“La ciencia no conoce su deuda a la imaginación”

Ralph Waldo Emerson

“Ser un buen científico no es cuestión de género”

Margarita Salas

“La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno,
justo y humano”

Marcus Jacobson

“La ciencia que la humanidad tiene en un momento dado depende de
lo que es la humanidad en ese momento”

Georg Simmel

“Ninguna ciencia es inmune a la infección de la política y la
corrupción del poder”

Jacob Bronowski

RESUMEN

La insuficiencia cardiaca (IC) es un síndrome multifactorial resultado de una compleja red de alteraciones estructurales, funcionales y moleculares que conducen a la progresión de la disfunción ventricular. La IC es denominador común de la mayoría de cardiopatías y su complejidad da lugar a diagnósticos y tratamientos imprecisos que comportan el aumento progresivo de su prevalencia, morbimortalidad y coste sanitario. Es por ello que existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias, a través de la investigación básica y clínica, que permitan diagnósticos más precisos y tratamientos más eficaces que las terapias actuales. Dicha compleja red de alteraciones en la morfología, composición e interacciones entre los distintos componentes del corazón se conoce como remodelado cardiaco. Histopatológicamente, el remodelado se caracteriza por proliferación y migración celular, fibrosis cardiaca, hipertrofia de cardiomiocitos y por muerte celular necrótica y apoptótica. Subyacente a estos procesos podemos encontrar, entre otros, alteraciones del metabolismo del colágeno que pueden conducir a rigidez ventricular y/o debilitamiento de las uniones estructurales y dilatación cardiaca, cuya progresión producirá disfunción ventricular e IC.

El principal objetivo de esta tesis es estudiar la fibrosis miocárdica y el remodelado cardiaco en pacientes con IC (miocardiopatía isquémica, MCI; y miocardiopatía dilatada, MCD) a través del análisis de expresión de las moléculas de colágeno, así como investigar la relevancia de las posibles alteraciones de su expresión mediante el

estudio de las relaciones con distintos marcadores moleculares del proceso de remodelado y con parámetros de disfunción ventricular.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la expresión de colágenos fibrilares y no fibrilares en ambas cardiomiopatías, destacando el porcentaje de genes codificantes de colágenos no fibrilares que se encuentran alterados y que no habían sido descritos en la IC hasta ahora. Los cambios en la expresión de algunos de estos colágenos fueron validados por *PCR* cuantitativa en tiempo real y, mediante *western blot*, se determinó que la alteración en la expresión se mantenía a nivel proteico.

En cuanto al estudio de la relación entre los cambios de la expresión de estos genes con parámetros de función y remodelado ventricular, así como con marcadores de fibrosis, hipertrofia y apoptosis por ser los principales procesos que subyacen al remodelado cardiaco, observamos que, en la MCI, la sobre-expresión de *COL4A5* y *COL16A1* está relacionada significativamente con la fracción de acortamiento y con los diámetros tele-sistólico y tele-diastólico del ventrículo izquierdo, respectivamente; mientras que, en la MCD, la sobre-expresión de *COL8A1* se relaciona con el índice de masa ventricular izquierdo. Además, encontramos relaciones significativas entre la alteración de estos colágenos y los marcadores moleculares de los principales procesos biológicos que tienen lugar durante el remodelado ventricular.

En definitiva, estos resultados confirman la hipótesis de la existencia de una alteración en la expresión de los genes que codifican colágenos fibrilares y no fibrilares que podría estar participando de forma crucial

en el desarrollo de remodelado cardiaco, proporcionando nuevas dianas para futuras investigaciones que permitan dilucidar el papel de estos colágenos y ofrecer nuevas opciones terapéuticas para las personas que padecen IC.

RESUM

La insuficiència cardíaca (IC) és una síndrome multifactorial resultat d'una complexa xarxa d'alteracions estructurals, funcionals i moleculars que conduïxen a la progressió de la disfunció ventricular. La IC es denominador comú de la majoria de cardiopaties i la seua complexitat dóna lloc a diagnòstics i tractaments imprecisos que comporten l'augment progressiu de la seua prevalença, morbimortalitat i cost sanitari. Es per això que existix la necessitat de desenvolupar noves estratègies, a través de la investigació bàsica i clínica, que permeten diagnòstics més precisos i tractaments més eficaços que les teràpies actuals. Dita complexa xarxa d'alteracions en la morfologia, composició i interaccions entre els distints components del cor es coneix com remodelat cardíac. Histopatològicament, el remodelat es caracteritza per proliferació i migració cel·lular, fibrosi cardíaca, hipertròfia de cardiomiòcits i per mort cel·lular necròtica i apoptòtica. Subjacent a estos processos podem trobar, entre altres, alteracions del metabolisme del col·lagen que poden conduir a rigidesa ventricular i/o debilitament de les unions estructurals i dilatació cardíaca, la progressió dels quals produirà disfunció ventricular i IC.

El principal objectiu d'esta tesi és estudiar la fibrosi miocardiàica i el remodelat cardíac en pacients amb IC (miocardiopatia isquèmica, MCI; i miocardiopatia dilatada, MCD) a través de l'anàlisi d'expressió de les molècules de col·lagen, així com investigar la rellevància de les possibles alteracions de la seua expressió mitjançant l'estudi de les

relacions amb distints marcadors moleculars del procés de remodelat i amb paràmetres de disfunció ventricular.

Els resultats obtinguts mostren un augment en la expressió de col·làgens fibril·lars i no fibril·lars en ambdues cardiomiopaties, destacant el percentatge de gens que codifiquen col·làgens no fibril·lars que es troben alterats i que no han sigut descrits en la IC fins ara. Els canvis en la expressió d'alguns d'estos col·làgens, van ser validats per *PCR* quantitativa en temps real i, mitjançant *western blot*, es determinà que l'alteració en l'expressió es mantenia a nivell proteic.

En quant al estudi de la relació entre els canvis de l'expressió d'aquestos gens amb paràmetres de funció i remodelat ventricular, així com amb marcadors de fibrosi, hipertrofia i apoptosi per ser els principals processos subjacents al remodelat cardíac, vam observar que, en la MCI, la sobre-expressió de *COL4A5* i *COL16A1* està relacionada significativament amb la fracció d'acurtament i amb els diàmetres tele-sistòlic i tele-diastòlic del ventricle esquerre, respectivament; mentre que, en la MCD, la sobre-expressió de *COL8A1* es relaciona amb l'índex de massa ventricular esquerre. A més, trobarem relacions significatives entre l'alteració d'aquestos col·làgens i els marcadors moleculars dels principals processos biològics que es produeixen durant el remodelat ventricular.

En definitiva, estos resultats confirmen la hipòtesi de l'existència d'una alteració en la expressió dels gens que codifiquen col·làgens fibril·lars i no fibril·lars que podrien estar participant de forma crucial en el desenvolupament de remodelat cardíac, proporcionant noves

dianes per a futures investigacions que permeten dilucidar el paper d'estos col·làgens i oferir noves opcions terapèutiques per a les persones que pateixen IC.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is a multifactorial syndrome resulting from a complex network of structural, functional and molecular alterations that ultimately lead to ventricular dysfunction. HF is the common denominator in most heart diseases, and its complexity originates imprecise diagnoses and treatments, so that its prevalence, morbidity and mortality increase progressively. For this reason, there is a significant requirement to develop new strategies through basic scientific and clinical research that will enable more accurate diagnoses and more effective treatments than are currently available. The complex network of alterations in the morphology, composition, and interactions between different components of the heart is known as cardiac remodelling. Histopathologically, remodelling is characterised by cell proliferation and migration, fibrosis, cardiomyocyte hypertrophy, and apoptotic and necrotic cell death. Underlying these processes, we have found, among others, alterations in collagen turnover within the myocardium that may lead to ventricular stiffness and/or weakening of structural linkages and cardiac dilation. Progression of these states is accompanied by ventricular dysfunction and HF.

The main objective of this thesis is to study myocardial fibrosis and cardiac remodelling in patients with HF (ischaemic cardiomyopathy, ICM, and dilated cardiomyopathy, DCM) through analysis of the expression of collagen molecules, as well as to investigate the relevance of possible alterations in their expression by studying relationships with

molecular markers of the remodelling process and with parameters of ventricular dysfunction.

Our results show an increase in the expression of both fibrillar and non-fibrillar collagens in both cardiomyopathies, highlighting changes in the number of non-fibrillar collagen genes that have not previously been described in HF. Changes in the expression of some of these collagens were validated by quantitative real-time PCR. Alterations in expression at protein level were shown by western blot.

Regarding the relationship between changes in collagen gene expression and parameters of ventricular remodelling and function, as well as with markers of fibrosis, hypertrophy, and apoptosis, the main processes underlying cardiac remodelling, we observed that in patients with ICM, *COL4A5* and *COL16A1* overexpression is significantly related to the shortening fraction and left ventricular end-systolic and end-diastolic diameters, respectively; whereas in the DCM group, *COL8A1* overexpression is related to left ventricular mass index. In addition, we observed significant relationships between the changes in these collagens and established molecular markers for the major biological processes that occur during ventricular remodelling.

In conclusion, these results support the hypothesis that alterations in the expression of genes encoding fibrillar and non-fibrillar collagens might be crucially involved in the development of cardiac remodelling. This in turn will identify new targets for future work aimed at elucidating the role of these collagens, and offer new therapeutic options for patients with HF.

ABREVIATURAS

ACC/AHA: Colegio Americano de Cardiología/ Asociación Americana del Corazón (*American College of Cardiology/American Heart Association*).

ADNc: ADN complementario.

ARNr: ARN ribosómico.

CNT: control.

DTDVI: diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo.

DTSVI: diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo.

ECG: electrocardiograma.

ePCR: PCR de emulsión (*emulsion PCR*).

ESC: Sociedad Europea de Cardiología (*European Society of Cardiology*).

FA: fracción de acortamiento.

FACIT: colágenos asociados a fibrillas (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*).

FE: fracción de eyección.

HTA: hipertensión arterial.

IC: insuficiencia cardiaca.

MACIT: colágenos asociados a membrana (*membrane-associated collagens with interrupted triple helices*).

MCD: miocardiopatía dilatada.

MCI: miocardiopatía isquémica.

MEC: matriz extracelular.

MMPs: metaloproteinasas de matriz.

NC: no colágeno (*non-collagenous*).

NYHA: Asociación Neoyorquina del Corazón (*New York Heart Association*).

RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterona (*renin–angiotensin–aldosterone system*).

RIN: número de integridad del ARN (*RNA integrity number*).

RNA-seq: secuenciación de ARN (*RNA-sequencing*).

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*).

RT-qPCR: *PCR* cuantitativa en tiempo real (*real time quantitative polymerase chain reaction*).

SC: sistema del complemento.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*).

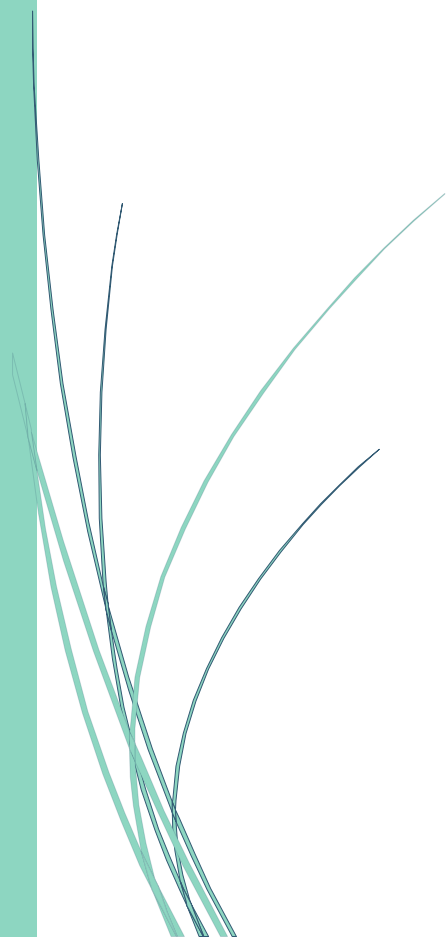
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*).

VI: ventrículo izquierdo.

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*).



ÍNDICE



| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. INSUFICIENCIA CARDIACA..... | 2 |
| 1.1 Definición y clasificación..... | 2 |
| 1.2 Etiología de la insuficiencia cardiaca | 6 |
| 1.3 Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca | 10 |
| 1.4 Diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardiaca..... | 18 |
| 1.5 Tratamiento de la insuficiencia cardiaca | 23 |
| 1.6 Prevalencia e incidencia de la insuficiencia cardiaca | 24 |
| 1.7 Comorbilidades y factores de riesgo | 26 |
| 2. REMODELADO CARDIACO..... | 29 |
| 2.1 Definición | 29 |
| 2.2 Remodelado e inflamación | 31 |
| 2.3 Remodelado y fibrosis | 35 |
| 2.3.1 Matriz extracelular y colágeno..... | 43 |
| 2.4 Remodelado e hipertrofia | 52 |
| 2.5 Remodelado y apoptosis..... | 55 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 59 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 62 |
| 1. COLECCIÓN DE MUESTRAS | 63 |
| 2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR SECUENCIACIÓN DE ARN | 67 |
| 2.1 Extracción de ARN total y aislamiento de ARN poli(A) | 69 |
| 2.2 Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN..... | 71 |
| 2.2.1 Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III ... | 71 |
| 2.2.2 Purificación del ARN fragmentado | 72 |
| 2.2.3 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ARN fragmentado | 72 |

| | |
|--|-----|
| 2.3 Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo | 73 |
| 2.3.1 Hibridación y ligación del ARN fragmentado | 73 |
| 2.3.2 Transcripción reversa..... | 73 |
| 2.3.3 Purificación del ADNc..... | 74 |
| 2.3.4 Selección del tamaño del ADNc | 74 |
| 2.3.5 Amplificación del ADNc | 75 |
| 2.3.6 Purificación del ADN amplificado | 76 |
| 2.3.7 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ADN amplificado | 76 |
| 2.4 <i>PCR</i> de emulsión | 76 |
| 2.4.1 Preparación de la reacción de <i>PCR</i> de emulsión | 76 |
| 2.4.2 Rotura de la emulsión y lavado de las <i>beads</i> | 79 |
| 2.4.3 Enriquecimiento de las <i>beads</i> amplificadas | 81 |
| 2.4.4 Modificación de los extremos 3' | 82 |
| 2.5 Secuenciación | 83 |
| 2.6 Análisis computacional de los resultados | 87 |
| 3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN DE ARN MEDIANTE <i>PCR</i> CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL | 89 |
| 3.1 Extracción de ARN total..... | 89 |
| 3.2 Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total..... | 90 |
| 3.3 Retrotranscripción a ADNc | 91 |
| 3.4 Reacción de <i>RT-qPCR</i> | 94 |
| 3.5 Cuantificación relativa de la expresión génica | 98 |
| 4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS..... | 101 |
| 4.1 Homogeneización y extracción proteica total | 101 |
| 4.2 Determinación de la concentración proteica | 101 |
| 4.3 <i>Western Blot</i> | 104 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida | 104 |
| 4.3.2 Transferencia en seco..... | 106 |
| 4.3.3 Tinción de geles | 109 |
| 4.3.4 Inmunodetección..... | 109 |
| 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 113 |
| 6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO..... | 114 |
| IV. RESULTADOS..... | 115 |
| 1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA | 116 |
| 1.1 Características clínicas de los pacientes | 116 |
| 1.2 Análisis de expresión génica | 118 |
| 1.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y remodelado ventricular | 124 |
| 1.4 Validación por <i>RT-qPCR</i> de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular..... | 126 |
| 1.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular..... | 127 |
| 1.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco..... | 129 |
| 2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA | 131 |
| 2.1 Características clínicas de los pacientes | 131 |
| 2.2 Análisis de expresión génica | 133 |
| 2.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y el remodelado ventricular..... | 139 |
| 2.4 Validación por <i>RT-qPCR</i> de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular..... | 140 |
| 2.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular..... | 141 |

| | |
|---|------------|
| 2.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco..... | 143 |
| V. DISCUSIÓN..... | 145 |
| 1. ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA | 146 |
| 2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA | 153 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 159 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 162 |
| VIII.PUBLICACIONES..... | 194 |



INTRODUCCIÓN

1. INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1 Definición y clasificación

La insuficiencia cardiaca (IC) puede definirse como una anomalía de la estructura o función cardiaca que provoca que el corazón sea incapaz de suministrar oxígeno a la tasa requerida por los tejidos para su metabolismo, o que solo sea capaz de hacerlo a expensas de un incremento en las presiones de llenado¹.

Desde un punto de vista clínico, el Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología –*European Society of Cardiology*– (ESC) define la IC como un síndrome en el que los pacientes presentan síntomas típicos, como la falta de aire o fatiga (disnea) tanto durante el ejercicio como en reposo, signos de retención de fluidos como congestión pulmonar o edemas en los tobillos, y otros signos típicos como la presión venosa yugular elevada, crepitaciones pulmonares e impulso apical desplazado, que se producen como resultado de una anomalía de la estructura o función cardiaca^{1, 2}.

Además de esta definición más general, en la práctica habitual se hace distinción entre IC aguda y crónica. La IC aguda se caracteriza por una brusca aparición de síntomas y signos secundarios a una función cardiaca anormal y que pueden manifestarse con o sin previo diagnóstico de enfermedad cardiaca. La repentina aparición de los síntomas no permite la actuación de mecanismos compensadores, por lo que se desarrollan casos graves de congestión (edemas pulmonares agudos) o de hipoperfusión (shock cardiogénico)^{3, 4}.

La IC crónica es la forma más común de insuficiencia y por definición es la que se produce durante un período de tiempo prolongado⁴.

La IC se detecta clínicamente de manera habitual por una reducción de la fracción de eyección ($FE \leq 40\%$), que se define como la diferencia entre el volumen diastólico y el volumen sistólico dividida por el volumen diastólico, y multiplicada por 100:

$$FE = [(VTD - VTS)/VTD] \times 100$$

Donde VTD es el volumen tele-diastólico y VTS es el volumen tele-sistólico, valores que, para este proyecto de tesis, fueron obtenidos mediante ecocardiografía bidimensional y calculados mediante el método “área-longitud” biplano, donde se asume que el ventrículo izquierdo (VI) tiene forma de bala^{5, 6}.

- Clasificación funcional de la insuficiencia cardiaca

La disposición más utilizada para agrupar a los pacientes según la gravedad de sus síntomas es la clasificación funcional de la *New York Heart Association (NYHA)*, basada en el grado de limitación para la actividad y estado sintomático del individuo, y empleada para estimar el pronóstico del paciente. Esta clasificación (Tabla 1), a pesar de utilizarse ampliamente en la práctica clínica y la investigación, implica un importante grado de subjetividad tanto del paciente como del médico; además, la clase funcional de un determinado paciente puede variar en períodos breves de tiempo, especialmente cuando se dan situaciones de descompensación. Por este motivo, surge la clasificación

según la *American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA)* que incluye los estadios preclínicos y que refleja de forma sencilla la progresión del síndrome. En esta clasificación (Tabla 2), basada en la estructura y daño producido en el músculo cardíaco, el estadio A) engloba a pacientes en riesgo de desarrollar IC, el estadio B) designa a pacientes con daños estructurales del corazón, el estadio C) identifica la presencia de una alteración estructural cardíaca junto con la aparición de síntomas de IC, y por último el estadio D) se corresponde con pacientes con una cardiopatía estructural avanzada y resistente al tratamiento que requieren intervenciones especializadas para la implantación de dispositivos de asistencia ventricular, o en último término, el trasplante cardíaco^{7, 8}.

Tabla 1. Clasificación de la insuficiencia cardíaca según la *New York Heart Association*.

| | |
|------------------|--|
| Clase I | Sin limitación de la actividad física. La actividad física habitual no causa excesiva disnea, fatiga, o palpitaciones. |
| Clase II | Ligera limitación de la actividad física. Confortable en reposo pero la actividad física habitual produce disnea, fatiga, o palpitaciones. |
| Clase III | Marcada limitación de la actividad física. Confortable en reposo pero esfuerzos menores a los de la actividad física habitual provocan disnea, fatiga, o palpitaciones. |
| Clase IV | Incapaz de llevar a cabo cualquier tipo de actividad sin molestias. Síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo que aumentan si se lleva a cabo cualquier actividad física. |

(Modificada de McMurray J. et al.¹).

Tabla 2. Clasificación de la insuficiencia cardiaca según la *American College of Cardiology/American Heart Association*.

| Clase | Descripción | Ejemplos |
|----------|---|--|
| A | Pacientes con alto riesgo de desarrollar IC debido a afecciones que se asocian de modo muy estrecho con su desarrollo. No presentan anomalías estructurales o funcionales del pericardio, miocardio ni válvulas cardiacas, y nunca han mostrado datos clínicos de IC. | Hipertensión sistémica. Diabetes mellitus. Historia de tratamiento cardiotóxico o abuso de alcohol. Historia familiar de miocardiopatía. |
| B | Pacientes que han desarrollado una cardiopatía estructural pero nunca han mostrado signos o síntomas de IC. | Hipertrofia ventricular izquierda o fibrosis. Dilatación o hipocontratilidad del VI. Valvulopatía asintomática. |
| C | Pacientes con síntomas actuales o previos de IC asociados a una cardiopatía estructural de base. | Disnea o fatiga debidas a disfunción sistólica del ventrículo izquierdo. |
| D | Pacientes con cardiopatía estructural avanzada y síntomas acusados de IC, a pesar de tratamiento médico máximo, y que requieren intervenciones especializadas. | Pacientes frecuentemente hospitalizados por IC y que no pueden ser dados de alta con seguridad del hospital. Pacientes en espera de trasplante cardiaco. Pacientes con dispositivo de asistencia mecánica circulatoria. Pacientes con cuidados paliativos para el tratamiento de IC. |

IC, insuficiencia cardiaca; VI, ventrículo izquierdo. (Modificada de Segovia Cubero J. et al.⁴).

1.2 Etiología de la insuficiencia cardiaca

Las enfermedades que pueden dar lugar al desarrollo de IC son muy variadas, y frecuentemente es la combinación de varias de ellas lo que acaba causando este síndrome. La clasificación etiológica de la IC es fundamental para conformar un diagnóstico, tratamiento y prevención adecuados, puesto que pueden condicionar el pronóstico de los pacientes⁹.

Aunque no existe una clasificación etiológica consensuada debido a la frecuencia de solapamientos entre las categorías de clasificación, de forma práctica podemos distinguir entre 3 tipos de causas de la IC: predisponentes, determinantes y precipitantes⁴ (Tabla 3).

- **Causas predisponentes**

Dentro de las causas predisponentes hablamos de causas etiológicas, probablemente etiológicas y no etiológicas. Las primeras se refieren a alteraciones estructurales, congénitas o adquiridas que producen la afección de la fisiología normal cardiaca. De todas ellas, la miocardiopatía isquémica (MCI) es la más relevante, puesto que es la causa más frecuente de IC y la principal causa de muerte en el mundo¹⁰.

Dentro de las causas predisponentes probablemente etiológicas es de destacar la hipertensión arterial (HTA) y la diabetes mellitus, comorbilidades que en muchos casos coexisten con la miocardiopatía isquémica. En el estudio SOLVD¹¹, el 70% de los casos de IC fueron de etiología isquémica, y un 7% atribuibles a la HTA. En una revisión realizada por Teerlink JR *et al.*¹², se observó que la HTA es la causa

primaria de IC en sólo el 4% de los pacientes, mientras que en sujetos hospitalizados es el 16%. Por otro lado, según Horowitz *et al.*¹³, la prevalencia de MCI (75%) y diabetes (20-35%) aumenta en la población con IC.

Las causas predisponentes no etiológicas se muestran en la Tabla 3 y han de ser entendidas como marcadores de riesgo.

- Causas determinantes

Las causas determinantes de IC son las que alteran los mecanismos reguladores de la función ventricular, las condiciones de carga hemodinámica y la frecuencia cardíaca. Estas causas, a su vez, se clasifican en miocardiopatías, sobrecargas hemodinámicas, defectos del llenado ventricular y alteraciones del ritmo cardíaco.

Dentro del grupo de miocardiopatías existen distintas formas de clasificación, en parte debido a que constituyen un grupo muy heterogéneo cuyo nexo es una afección del músculo cardíaco que causa su disfunción en una amplia variedad de formas distintas, haciendo que su clasificación sea objeto permanente de discusión. Entre las clasificaciones de las miocardiopatías más utilizadas se encuentran la realizada por la Organización Mundial de la Salud –*World Health Organization*– y la Federación y Sociedad Internacional de Cardiología –*International Society and Federation of Cardiology*– (WHO/ISFC)¹⁴, la propuesta por la Asociación Americana del Corazón –*American Heart Association*– (AHA)¹⁵, y la realizada por la ESC¹⁶. Siguiendo la clasificación de la AHA, acorde a las más recientes, agrupamos las

miocardiopatías en primarias, cuando son enfermedades confinadas única o predominantemente al músculo cardíaco, y en secundarias, cuando la afección cardíaca se produce como resultado de una gran variedad de trastornos sistémicos generalizados¹⁵. Estas miocardiopatías secundarias corresponderían con las antiguas miocardiopatías específicas según la clasificación de la *WHO*, y pueden dividirse a su vez en genéticas, mixtas (genéticas y adquiridas), y adquiridas (Tabla 3)⁴.

Tabla 3. Clasificación etiológica de la insuficiencia cardíaca.

| CAUSAS | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|--|--|
| <u>PREDISPONENTES</u> | <i>Etiológicas</i> | Miocardiopatía isquémica, cardiopatías congénitas | |
| | <i>Probablemente etiológicas</i> | HTA, diabetes, historia de fiebre reumática | |
| | <i>No etiológicas</i> | Edad, sexo masculino, obesidad, tabaquismo | |
| <u>DETERMINANTES</u> | | <i>Genéticas</i> | Hipertrofica, arritmogénica del ventrículo derecho, por ventrículo izquierdo no compactado, por anomalías en el sistema de conducción, miopatía mitocondrial, por alteraciones de los canales iónicos cardíacos o canalopatías |
| | | <i>Mixtas</i> | Dilatada, restrictiva |
| | | <i>Adquiridas</i> | Miocarditis, miocardiopatía de estrés, miocardiopatía de periparto, por taquicardias ventriculares |
| | <i>Miocardiopatías</i> | Miocardiopatía isquémica, infiltrativas, metabólicas, tóxicas, endomiocárdicas, inflamatorias, endocrinas, neuromusculares, por déficit nutricional, autoinmunes, por alteraciones electrolíticas, secundarias a terapias contra el cáncer | |
| | <i>Secundarias</i> | | |
| | <i>De presión</i> | HTA, estenosis aórtica/pulmonar, hipertensión pulmonar | |
| <u>PRECIPITANTES</u> | <i>Sobrecarga ventricular</i> | <i>De volumen</i> | Insuficiencias valvulares, cortocircuitos intracardíacos |
| | <i>Llenado ventricular alterado</i> | Hipertrofia ventricular, estenosis mitral/tricuspid, tumores, taponamiento cardíaco, pericarditis constructiva | |
| | <i>Arritmias</i> | Bradicardia, taquicardia, taquimiocardiopatía | |
| | <i>Cardíacas</i> | Arritmias, isquemia miocárdica, fármacos inotrópicos negativos (antagonistas del Ca^{2+} , β -bloqueantes, antiarrítmicos) | |
| | <i>Extracardíacas</i> | Infecciones, incumplimientos del tratamiento, embolia pulmonar, anemia, fármacos (AINE), cirugía, esfuerzo, tóxicos | |

HTA, hipertensión arterial. (Modificada de Segovia Cubero J. et al.⁴).

En cuanto a las causas determinantes caracterizadas por una sobrecarga hemodinámica, pueden deberse a sobrecargas de presión o de volumen (Tabla 3).

Cuando las causas determinantes son defectos en el llenado ventricular como los representados en la Tabla 3, también pueden resultar en el desarrollo de IC.

- Causas precipitantes

Cuando hablamos de causas precipitantes nos referimos a factores que provocan la descompensación en pacientes que presentan una cardiopatía estructural subyacente con o sin diagnóstico previo de IC. Las causas precipitantes pueden dividirse en cardíacas y extracardiacas (Tabla 3).

1.3 Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca

El proceso dinámico por el cual la disfunción ventricular evoluciona hacia insuficiencia cardíaca tiene su origen en el daño miocárdico, que puede ser producido por cualesquiera de las causas mencionadas anteriormente, y que conduce a un descenso del gasto cardíaco. Esto supone la puesta en marcha de una serie de mecanismos compensadores cuyo objetivo inicial es mantener el gasto cardíaco y la presión arterial, asegurando la perfusión a los órganos vitales como el cerebro y el corazón, aunque sea a expensas de causar vasoconstricción. Para ello, se ponen en marcha mecanismos neurohormonales e inflamatorios que activan el sistema adrenérgico¹⁷ con la finalidad de mantener un volumen sanguíneo circulante suficiente que asegure la perfusión; se

activan además, moléculas vasodilatadoras como los péptidos natriuréticos¹⁸ y el óxido nítrico¹⁹ para contrarregular la excesiva vasoconstricción, y citoquinas²⁰ y factores de crecimiento²¹ que contribuyen a la hipertrofia y fibrosis cardíaca (Figura 1).

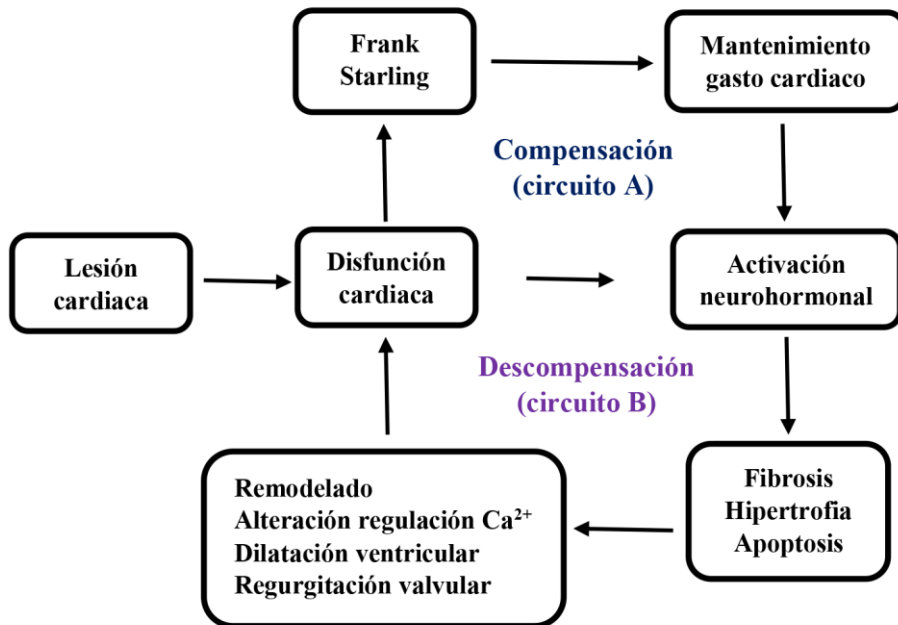
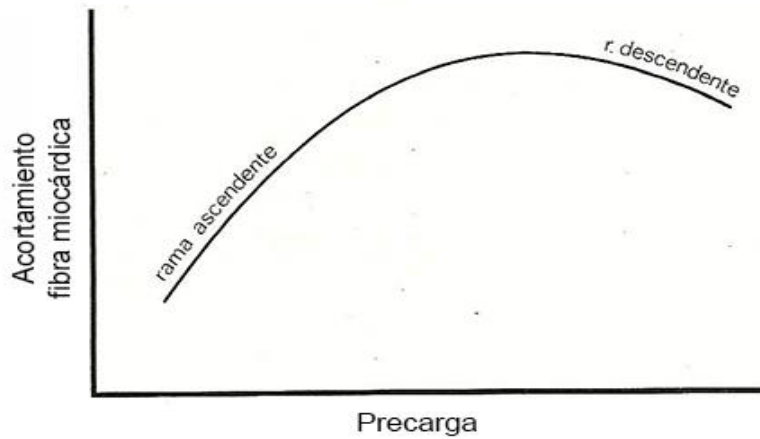


Figura 1. Esquema del proceso de evolución de la insuficiencia cardíaca.

La lesión miocárdica desencadena la disfunción contráctil que se compensa a través del mecanismo de Frank Starling y la activación neurohormonal (circuito A). Esta respuesta biológica esencial restaura por un período determinado el gasto cardíaco. En caso de lesión permanente, la activación constante de los mecanismos de compensación inicia el proceso de remodelado cardíaco (circuito B), que resultará en el desarrollo de insuficiencia cardíaca. (Modificado de Arad, M. et al.²²).

De esta manera se mejora la función a expensas de un aumento del llenado diastólico (precarga), mecanismo que se describe por la ley de Frank-Starling que expone la capacidad de adaptación de la fibra muscular cardíaca en función del retorno venoso a través de la regulación de la contracción (Figura 2A). Como resultado se produce el aumento del volumen sistólico (V_s) en respuesta a un aumento de la precarga, respuesta que dependerá de la función ventricular del individuo (Figura 2B). Si bien inicialmente el paciente puede permanecer asintomático durante un tiempo, la constante activación de los mecanismos de compensación puede dar lugar a cambios en la arquitectura ventricular, proceso que se conoce como remodelado cardíaco, y que desencadenará el deterioro progresivo de la función cardíaca²³.

A)



B)

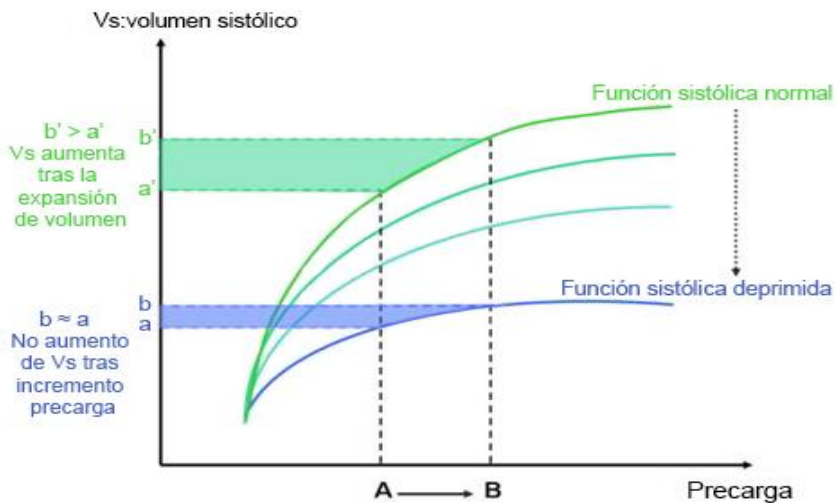


Figura 2. Representación gráfica del mecanismo de Frank Starling. A) el acortamiento de la fibra miocárdica aumenta con la precarga hasta un cierto límite [2,2-2,4 μm (rama ascendente)]; sobrepasado ese límite existe una relación inversa entre el grado de elongación y la respuesta contráctil de la fibra (r. descendente). B) Representación esquemática de la relación ventricular de precarga/volumen sistólico (Vs); en un paciente con función sistólica deprimida el incremento del Vs en respuesta a la precarga es insuficiente o nulo. (Extraída de Martín Jadraque L. et al.²⁴, y modificada de www.ffis.es).

Dos de las etiologías más frecuentes y principales causas de IC son la miocardiopatía isquémica y la miocardiopatía dilatada (MCD). Debido a la alta prevalencia de la MCI, en la práctica clínica es común clasificar la IC en MCD no isquémica y MCI²⁵. Por ello, este trabajo de tesis doctoral centra su estudio en pacientes con MCI y pacientes con MCD idiopática de causa no isquémica. En ambas etiologías se producen cambios progresivos en la composición, morfología e interacciones entre los distintos componentes del corazón, siendo de especial relevancia las alteraciones del metabolismo del colágeno y consecuentemente de la matriz extracelular, que dan lugar a remodelado cardíaco²⁶⁻²⁸.

La miocardiopatía isquémica está caracterizada por pérdida de cardiomiocitos, hipertrofia, formación de tejido cicatrizal y fallo ventricular. Se produce como resultado del estrechamiento u oclusión de la circulación coronaria por aterosclerosis, espasmo de las ramas epicárdicas o intramurales de la vasculatura coronaria, o alteraciones de la red capilar o microcirculación. Esto da lugar a un desequilibrio continuo entre el aporte de oxígeno y nutrientes, y la demanda cardíaca, lo que origina grados variables de isquemia y lesión tisular^{26, 29} (Figura 3). Como consecuencia, el tejido miocárdico no dañado ha de sostener el bombeo cardíaco, para lo que se activan mecanismos de compensación que desencadenan principalmente hipertrofia de cardiomiocitos, e hiperplasia de fibroblastos y células endoteliales.

Así, el espectro clínico resultante puede variar desde el infarto agudo de miocardio hasta la miocardiopatía isquémica crónica que se desarrolla años después de la pérdida inicial de tejido funcional²⁹.

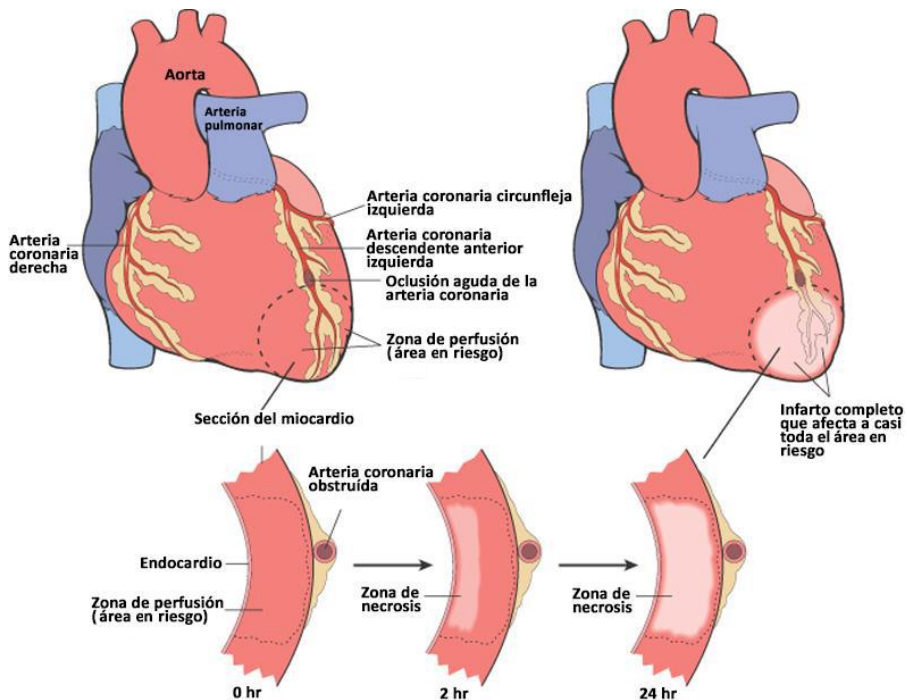


Figura 3. Representación de un infarto de miocardio por oclusión arterial coronaria. Se produce una progresión de la necrosis miocárdica tras la obstrucción del flujo sanguíneo. (Modificada de Kumar V. et al.³⁰).

La MCI ha sido, y continúa siendo, la principal causa de muerte en el mundo. Solo en 2013 causó más de 8 millones de muertes en todo el mundo, un 41,9% más de las muertes por MCI producidas en 1990¹⁰.

La miocardiopatía dilatada es una enfermedad del músculo cardíaco caracterizada por dilatación ventricular y disfunción miocárdica que comúnmente conduce a arritmias, insuficiencia cardíaca e incluso muerte súbita (Figura 4). En la mayoría de casos no llega a identificarse la causa subyacente de esta patología, por lo que se catalogan como idiopáticos o primarios (MCD idiopática)^{14, 31}.

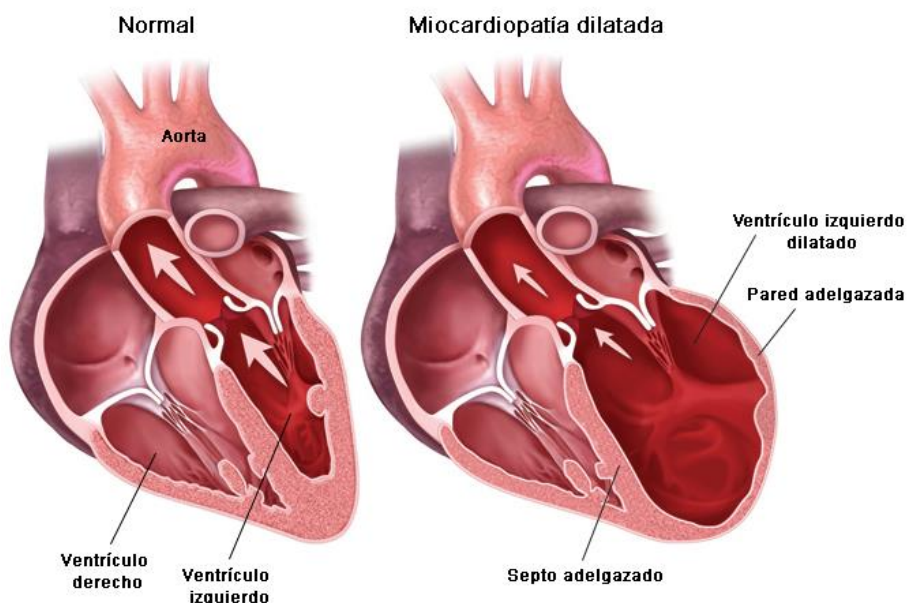


Figura 4. Representación de los cambios morfológicos de un corazón con miocardiopatía dilatada frente a un corazón normal. (Modificada de www.blogdefarmacia.com).

La MCD idiopática se presenta con una tasa anual de 5 a 8 casos por 100.000 personas, y es menos frecuente que la MCD específica o secundaria (Tabla 4), cuyas causas pueden ser de origen infeccioso, metabólico, isquémico, tóxico o hereditario²⁵. Es importante destacar

que en algunos casos puede presentarse como un cuadro reversible que mejoraría, dependiendo de la etiología, al evitar ciertos estímulos. La mortalidad de la MCD se sitúa alrededor del 20% a los 5 años tras el diagnóstico³².

Tabla 4. Etiología de la miocardiopatía dilatada.

| Idiopática o primaria | — | |
|--------------------------------|------------------------------|--|
| Específica o secundaria | Isquémica | — |
| | Hereditaria | — |
| | Enfermedades inflamatorias | <i>Sarcoidosis, enfermedades del colágeno, miocardiopatía periparto.</i> |
| | Enfermedades neuromusculares | <i>Distrofia de Duchenne, Becker, de Steinert, ataxia de Friedreich.</i> |
| | Enfermedades metabólicas | <i>Enfermedad de Pompe, alteraciones de la β-oxidación y cadena respiratoria.</i> |
| | Enfermedades endocrinas | <i>Diabetes, alteraciones tiroideas, feocromocitoma, acromegalia, enfermedad de Cushing.</i> |
| | Enfermedades infiltrativas | <i>Hemocromatosis, amiloidosis.</i> |
| | Infecciosas | <i>Bacterianas, víricas y por parásitos.</i> |
| | Tóxicos | <i>Alcohol, anfetaminas, antraciclinas, metales.</i> |
| | Deficiencias nutricionales | <i>Selenio, carnitina, vitamina B1.</i> |
| | Alteraciones electrolíticas | <i>Hipocalcemia, hipofosfatemia, uremia.</i> |
| | Radiación | — |

(Modificada de www.pediatruiintegral.es).

1.4 Diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardiaca

Muchos de los síntomas de la IC no son específicos, y algunos signos más específicos como la presión venosa yugular elevada y el impulso apical desplazado son, a su vez, difíciles de detectar y menos reproducibles. Por otro lado, muchos de los signos de la IC se producen como consecuencia de la retención de sodio y agua, y desaparecen rápidamente con el tratamiento con diuréticos, por lo que tampoco son específicos. Los síntomas y signos resultan sustancialmente difíciles de identificar en personas mayores, con obesidad, o en pacientes con enfermedad pulmonar crónica. Por todo ello, el diagnóstico de IC puede ser complicado, especialmente durante las etapas iniciales de la enfermedad^{1, 33}.

De esta manera, todo paciente con síntomas de IC debería someterse a un estudio que incluyese:

- Historia clínica y exploración física: debe incluir los factores de riesgo cardiovascular, hábitos tóxicos y comorbilidades. Se debe poner especial atención a la identificación, con la máxima precisión, de los síntomas y signos del paciente⁴ (Tabla 5).

Tabla 5. Síntomas y signos de la insuficiencia cardiaca.

| Síntomas | Signos |
|---|---|
| <i>Típicos</i> | <i>Más específicos</i> |
| <ul style="list-style-type: none"> -Disnea, ortopnea y disnea paroxística nocturna. -Baja tolerancia al ejercicio. -Fatiga. -Hinchazón de tobillos. | <ul style="list-style-type: none"> -Presión venosa yugular elevada. -Reflujo hepatoyugular. -Tercer sonido del corazón (ritmo galopante). -Impulso apical desplazado lateralmente. |
| <i>Menos típicos</i> | <i>Menos específicos</i> |
| <ul style="list-style-type: none"> -Tos nocturna. -Sibilancias. -Hinchazón. -Pérdida de apetito. -Confusión (especialmente en ancianos). -Depresión. -Palpitaciones. -Mareos. -Síncope. -Bendopnea. | <ul style="list-style-type: none"> -Aumento de peso (>2kg/semana). -Pérdida de peso (insuficiencia cardiaca avanzada). -Pérdida de tejido (caquexia). -Soplo cardiaco. -Edema periférico (tobillos, del sacro, escrotal). -Crepitaciones pulmonares. -Menor entrada de aire y matidez a la percusión en las bases pulmonares (efusión pleural). -Taquicardia. -Pulso irregular. -Taquipnea. -Respiración de Cheyne-Stokes. -Hepatomegalia. -Ascitis. -Extremidades frías. -Oliguria. -Presión de pulso estrecha. |

(Modificada de Ponikowski P. et al.³³).

- Pruebas de laboratorio: los estudios hematológicos y bioquímicos son importantes para la detección de factores precipitantes como la anemia o la isquemia, además de otros factores de riesgo como la enfermedad tiroidea, la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia, o para controlar la función renal que puede verse afectada tras el inicio del tratamiento. Medir la concentración en sangre del péptido natriurético tipo B (BNP) y la fracción aminoterminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es muy útil como prueba de descarte en el diagnóstico de IC; valores normales de estos péptidos excluyen prácticamente de enfermedad cardíaca significativa^{1, 4} (Figura 5).
- Electrocardiograma (ECG): un ECG normal sugiere que el diagnóstico de IC no es posible con un valor predictivo negativo del 98%, pero un ECG patológico tiene un valor predictivo positivo del 35%³⁴. Aun así, es una herramienta útil para detectar alteraciones del ritmo, frecuencia y conducción cardíaca, además de hipertrofia.
- Radiografía de tórax: útil para la detección de cardiomegalia, congestión pulmonar o derrame pleural y para valorar la evolución del cuadro de IC; sin embargo solo tiene valor predictivo en el contexto de síntomas y signos típicos y con un ECG patológico.
- Ecocardiografía-Doppler (eco-Doppler): es la exploración más informativa en el estudio de la IC, permite cuantificar las funciones sistólica y diastólica ventriculares, el grosor de la

pared, y la función valvular, así como diagnosticar enfermedades del pericardio, patrones típicos de afección del miocardio y malformaciones congénitas; gracias a ello permite determinar la etiología en muchos casos de la IC y aporta una información pronóstica importante^{1, 35}.

- Estudios adicionales: pruebas no invasivas adicionales como la resonancia magnética cardíaca, la tomografía computarizada o la gammagrafía cardíaca, se realizan en pacientes en los que la ecocardiografía no proporciona suficiente información, y en pacientes con sospecha de enfermedad coronaria. Adicionalmente, pruebas invasivas como la angiografía coronaria, el cateterismo cardíaco y la biopsia endomiocárdica se llevan a cabo para tratar de determinar la etiología de la enfermedad, obtener mayor información pronóstica o cuando se desea evaluar la necesidad de revascularización².

En la Figura 5 se representa un algoritmo para el diagnóstico de la IC³⁶.

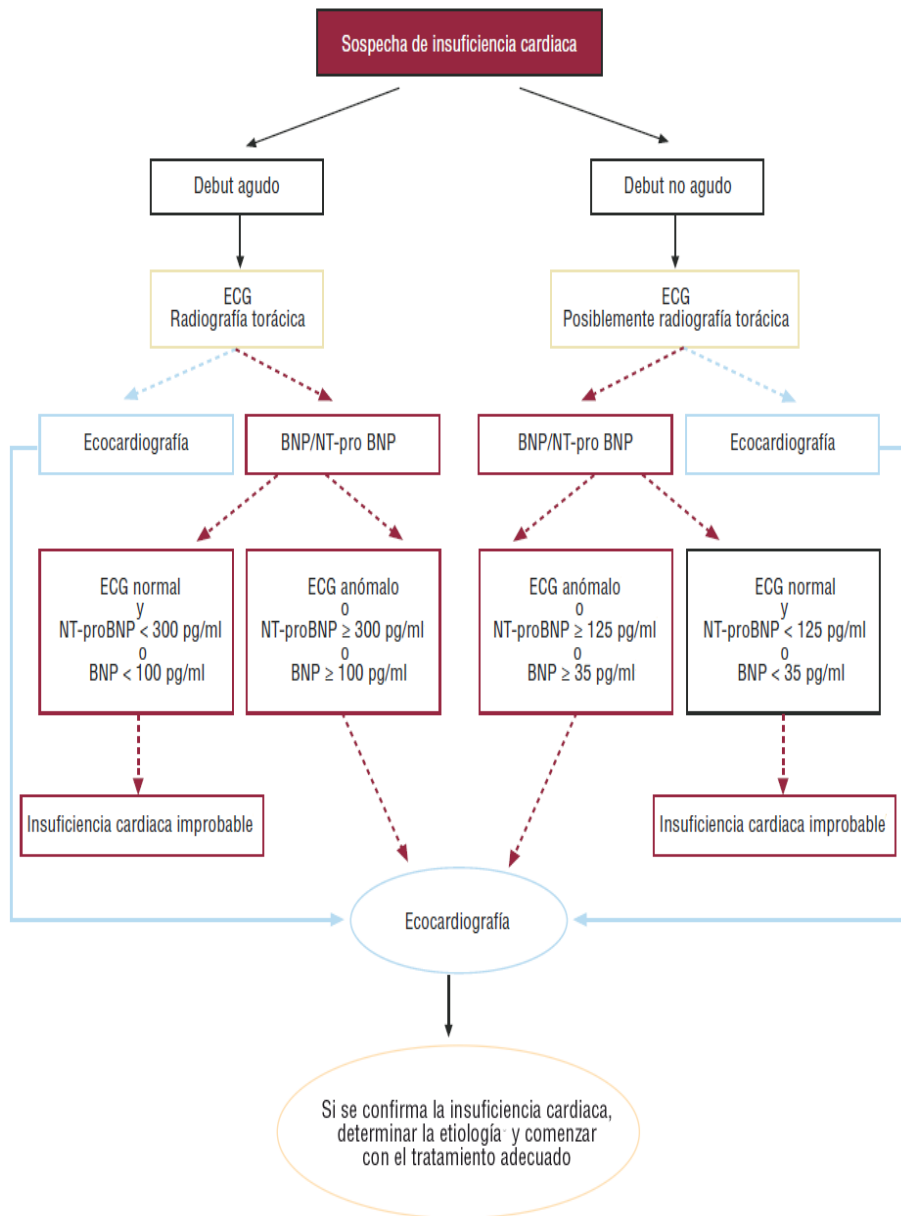


Figura 5. Algoritmo para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca. ECG, electrocardiograma; BNP, péptido natriurético tipo B; NT-proBNP, fracción N-terminal del propéptido natriurético tipo B. (Extraída de McMurray J et al.³⁶).

En cuanto al pronóstico de la IC, la mejora en la efectividad de los tratamientos ha permitido reducir las tasas de hospitalización y mejorar la supervivencia, con una reducción media del 40% de la tasa de mortalidad entre 1987 y 2008, según un estudio realizado a nivel europeo por Laribi *et al.*³⁷. A pesar de ello, la IC es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios urgentes, ocupa el 10% de las camas hospitalarias y representa aproximadamente el 2% de los gastos sanitarios nacionales, suponiendo un gran impacto económico en la sanidad^{2, 38}. Su pronóstico es comparable a las formas más comunes de cáncer. Exceptuando el cáncer de pulmón, la IC se asocia con la peor tasa de supervivencia a los 5 años (25% para ambos sexos), con una tasa de mortalidad del 59% a los 5 años y una pérdida de esperanza de vida de 6,8 años/1.000 habitantes en hombres y 5,1 años/1.000 habitantes en mujeres^{39, 40}.

1.5 Tratamiento de la insuficiencia cardiaca

Los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la IC se podrían englobar en 4 grandes grupos: vasodilatadores, inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (*renin-angiotensin-aldosterone-system*; RAAS), bloqueantes β -adrenérgicos y fármacos diuréticos⁴¹.

- Inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (IECA y ARAII): reducen los niveles plasmáticos y tisulares de aldosterona y angiotensina II (AngII), produciendo vasodilatación arteriovenosa, disminuyendo las resistencias

periféricas, y aumentando el volumen minuto y la natriuresis.

- Diuréticos: originan una pérdida neta de Na^+ y agua del organismo, produciendo una rápida mejoría de los síntomas (disnea, congestión pulmonar, etc.). Por si solos no son capaces de controlar el cuadro de IC por lo que suelen ir asociados a digoxina y/o inhibidores del RAAS.
- Bloqueantes β -adrenérgicos: mejoran la situación hemodinámica, la fracción de eyección y la tolerancia al ejercicio, bloqueando las acciones cardiotóxicas de las catecolaminas, e inhibiendo la activación neurohormonal (renina y noradrenalina). Además poseen propiedades antiarrítmicas y antihipertensivas.
- Vasodilatadores: actúan reduciendo la precarga y/o poscarga mejorando los signos de congestión pulmonar y disminuyendo los signos de hipoperfusión periférica.

1.6 Prevalencia e incidencia de la insuficiencia cardiaca

Las enfermedades cardiovasculares representan la causa número uno de muerte en el mundo, con 17,5 millones de muertes en 2012, destacando entre ellas la MCI (7,4 millones de muertes/año) y los accidentes cerebrovasculares (6,7 millones de muertes/año). Respecto al año 2000, ha supuesto un aumento de la mortalidad debido a estas enfermedades del 14,8% ⁴².

En particular, la IC es un síndrome cuya prevalencia aumenta con la edad, pasando de un 0,7% en personas entre 45 y 54 años, a un 8,4% en personas ≥ 75 años⁴³. Esta tendencia también queda recogida en el estudio Rotterdam, donde la prevalencia de la IC aumenta progresivamente desde un 1% en personas con un rango de edad comprendido entre 55 y 64 años, a un 3% en el grupo de edades entre 65 y 74 años, un 7% en el grupo con edades comprendidas entre 75 y 84 años, y a más de un 10% en personas con ≥ 85 años⁴⁴. De manera general, los estudios estiman que la prevalencia de la IC oscila entre el 2-3%⁴⁵, con aproximadamente 23 millones de individuos en todo el mundo diagnosticados de IC⁴⁶, habiendo en la población adulta de países desarrollados una prevalencia del 1-2%, y alcanzando $\geq 10\%$ en personas mayores de 70 años^{33, 43, 47}. Además, la IC afecta en mayor proporción a hombres que a mujeres; el riesgo de IC a los 55 años es del 33% para los hombres y del 28% para las mujeres⁴⁸, aunque a edades avanzadas la prevalencia entre ambos sexos se iguala.

Al igual que la prevalencia, la incidencia de IC es mayor en hombres que en mujeres y aumenta con la edad. Según muestra el estudio Framingham, la incidencia en hombres fue de 5,64/1.000 habitantes-año y de 3,27/1.000 habitantes-año en mujeres, aumentando la incidencia casi a 10/1.000 habitantes-año cuando su edad era > 65 años^{49, 50}. De manera similar, en el estudio Rotterdam la incidencia aumenta desde 2,5/1.000 habitantes-año en personas con un rango de edad entre 55 y 64 años hasta 44/1.000 habitantes-año en personas > 85 años, siendo la IC más común en hombres (15/1.000 habitantes-año)

que en mujeres (12/1.000 habitantes-año)⁴⁸. Sin embargo, a pesar de una prevalencia creciente, la mayoría de estudios indican que la incidencia de IC se ha estabilizado, lo que podría reflejar el descenso de la incidencia en los grupos de menor edad en contraposición a su aumento en personas ancianas como se ha mostrado^{49, 51, 52}.

1.7 Comorbilidades y factores de riesgo

Los pacientes con IC a menudo padecen múltiples comorbilidades que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad y que están vinculadas a un peor pronóstico. Cerca del 60% de los adultos con IC tienen 5 o más enfermedades crónicas asociadas, porcentaje que se ha incrementado drásticamente en las dos últimas décadas⁵³.

Las comorbilidades aumentan el riesgo de hospitalización, reingreso y muerte en pacientes con IC, además de prolongar su estancia hospitalaria. Los pacientes con múltiples comorbilidades representan el 81% del total de días de hospitalización experimentados por el grupo de pacientes con IC⁵⁴. Entre las comorbilidades más frecuentes destacan la HTA, la isquemia y la hiperlipidemia (Tabla 6).

Tabla 6. Comorbilidades más frecuentes en pacientes con insuficiencia cardiaca.

| Mayores de 65 años | | Menores de 65 años | |
|-----------------------|-------|---------------------|-------|
| Hipertensión | 84,2% | Hipertensión | 80,7% |
| Isquemia | 71,9% | Isquemia | 64,0% |
| Hiperlipidemia | 60,0% | Diabetes | 59,2% |
| Anemia | 50,0% | Hiperlipidemia | 56,9% |
| Diabetes | 46,3% | Anemia | 49,7% |
| Artritis | 43,5% | Insuficiencia renal | 45,0% |
| Insuficiencia renal | 42,3% | Depresión | 36,2% |
| EPOC | 30,0% | Artritis | 35,3% |
| Fibrilación auricular | 28,5% | EPOC | 33,4% |
| Alzheimer/demencia | 27,6% | Asma | 15,5% |

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (*Extraída de Castro-Fernández A., et al.*⁵³).

Por su relevancia en la génesis y progresión de la IC sería conveniente que las comorbilidades estuviesen incluidas en los algoritmos diagnósticos y terapéuticos de la IC, lo que ayudaría a identificar grupos de pacientes con perfiles clínicos y objetivos terapéuticos distintos, y a mejorar el pronóstico de este síndrome.

En cuanto a los factores de riesgo, se clasifican como factores de riesgo no modificables la edad, el sexo y la raza. Respecto a la edad y el sexo, la prevalencia e incidencia de la IC aumenta progresivamente a partir de los 50 años, siendo más común en varones que en mujeres; sin embargo, a partir de los 65 años el riesgo de padecer IC se iguala para ambos sexos^{2, 47}.

Respecto a la raza hay estudios que muestran una mayor incidencia de IC en individuos de raza negra³². La tasa de mortalidad por IC en

2006 fue de 103,7 por 100.000 muertes para varones blancos, 105,9 para varones negros, 80,3 por 100.000 muertes para mujeres de raza blanca y 84,4 para mujeres de raza negra⁴⁵. Estas diferencias entre razas aumentan cuando la tasa de mortalidad se calcula teniendo en cuenta los 5 primeros años tras la primera hospitalización por IC. Según el estudio ARIC, la tasa de mortalidad fue de 41,2 por 100.000 muertes para varones blancos, 51,8 para varones negros, 35,8 para mujeres de raza blanca y 46,1 para mujeres de raza negra⁵⁵.

Entre los factores de riesgo modificables más comunes destacan el tabaquismo, la obesidad, la inactividad física, y el estrés. El riesgo de desarrollo de IC es mayor tanto en fumadores como en exfumadores. La incidencia de la patología coronaria en los fumadores es tres veces mayor que en el resto de la población, y la posibilidad de padecer una enfermedad de corazón es proporcional a la cantidad de cigarrillos fumados al día y al número de años en los que se mantiene este hábito nocivo. La obesidad favorece el desarrollo de comorbilidades como la hipertensión y la diabetes. Se estima que en personas obesas es 2,5 veces más frecuente padecer HTA que en personas de peso normal. En cuanto a la inactividad física, una persona sedentaria tiene más riesgo de sufrir aterosclerosis, HTA y enfermedades respiratorias. Por otro lado, el estrés se asocia con un mayor riesgo de sufrir un episodio cardiovascular. Se ha observado que existe el doble de riesgo de padecer infarto agudo de miocardio durante las dos horas siguientes a un episodio significativo de alteración emocional o estrés⁵⁶.

2. REMODELADO CARDIACO

2.1 Definición

En 1806, Jean-Nicolas Corvisart en su obra de referencia titulada “*Essai sur les maladies et les lésions organiques du coeur*” distingue por primera vez entre aneurismas activos –cuando se produce engrosamiento de la pared del corazón y un aumento de la fuerza de contracción– y aneurismas pasivos –cuando tiene lugar adelgazamiento de la pared y un descenso en la fuerza de contracción⁵⁷, lo que conocemos hoy día como hipertrofia y dilatación cardíacas respectivamente, dos formas de remodelado cardíaco. No es hasta 1982 que el término remodelado es utilizado por Hochman y Bulkley para describir un mecanismo de reemplazo de tejido necrótico por cicatrizal tras un proceso de isquemia miocárdica⁵⁸. Hemos de esperar dos años más para encontrar el término remodelado definido con más detalle y referido ya a un concepto más actual, donde se describen los cambios estructurales tempranos y tardíos producidos como consecuencia del infarto de miocardio provocado en un modelo murino tras la ligación de la arteria coronaria⁵⁹. Dada la extensión del término remodelado y su aplicación en una gran variedad de entidades clínicas, en el año 2000 se celebra el foro internacional “*International Forum on Cardiac Remodeling*” donde se establecen las bases, conceptos y criterios para determinar el remodelado cardíaco. En dicho foro, se define por consenso este proceso como “cambios moleculares, celulares e intersticiales, y cambios en la expresión del genoma que se manifiestan clínicamente como cambios en el tamaño, forma y función del corazón

tras una lesión cardíaca”⁶⁰. Ejemplo de lesiones cardíacas son el infarto de miocardio, enfermedades inflamatorias del corazón como la miocarditis, la MCD idiopática, y las sobrecargas de presión y volumen que se dan como consecuencia de estenosis aórtica, hipertensión, regurgitación valvular, etc.⁶⁰.

Histopatológicamente, el remodelado se caracteriza por el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos, por proliferación y migración celular, fibrosis cardíaca, y por muerte celular necrótica y apoptótica. El aumento de la fibrosis y del metabolismo del colágeno en el miocardio conduce a rigidez ventricular y/o debilitamiento de las uniones estructurales y dilatación cardíaca, cuya progresión producirá disfunción ventricular e IC^{61, 62}.

A nivel molecular, el proceso de remodelado podría dividirse en tres fases solapantes: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de maduración de la cicatriz.

Durante la fase inflamatoria, las células cardíacas que han muerto vía apoptosis o necrosis, liberan proteínas a la circulación desencadenando la respuesta inmune. Se activa el Sistema del Complemento (SC), la producción de especies reactivas de oxígeno (*ROS*) y cascadas de citoquinas dando lugar al reclutamiento e infiltración de neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y mastocitos. Estas células actúan reparando el tejido dañado, eliminando los cardiomiocitos muertos y restos de la matriz extracelular (MEC), y secretando factores de crecimiento y nuevas citoquinas que inducirán la proliferación celular y síntesis de proteínas de la matriz⁶³⁻⁶⁵.

Durante la fase de proliferación, los fibroblastos y las células endoteliales se infiltran en el área dañada. Se induce la angiogénesis y los fibroblastos proliferan y se diferencian a miofibroblastos, capaces de sintetizar proteínas de la MEC tales como el colágeno, que reemplazarán al tejido muerto iniciando la fase de maduración^{65, 66}. En esta tercera fase, el colágeno sintetizado se organiza en fibras que son estabilizadas por la formación de enlaces covalentes, originándose así la cicatriz fibrótica que proporciona la fuerza de tensión necesaria para prevenir la ruptura del tejido cardíaco^{67, 68}.

La excesiva deposición de colágeno que se produce en respuesta al aumento del estrés de pared cardíaca, da lugar a un proceso de remodelado adverso, patológico, que resultará en insuficiencia cardíaca^{69, 70}.

2.2 Remodelado e inflamación

Durante el proceso de desarrollo de remodelado miocárdico se produce la activación de diversas cascadas de señalización que desencadenan cambios a nivel molecular y celular que se transformarán en cambios morfológicos y funcionales, resultando en depresión de la función cardíaca. Ejemplo de ello son la activación de respuestas inflamatorias (activación del SC) y del RAAS.

La respuesta inflamatoria se desarrolla en mayor o menor grado en función del tipo de cardiomiopatía y/o extensión del daño cardíaco. En pacientes hipertensos, con estenosis aórtica o con MCD, donde la sobrecarga de presión es la condición fisiopatológica común en el

desarrollo del remodelado cardiaco, la intensidad de la respuesta inflamatoria será menor que en personas que hayan sufrido un infarto cardiaco. En estos últimos, la intensidad de la respuesta inflamatoria se producirá en función del tamaño del infarto^{71, 72, 73}.

Durante la fase inflamatoria, en respuesta a señales de daño o muerte celular, aumento en la producción de *ROS*, o acciones proinflamatorias mediadas por *RAAS*, se produce la activación de la respuesta inmune innata y, por consiguiente, la inducción de quimiocinas y citoquinas⁶⁴. El Sistema del Complemento es uno de los componentes principales de esta respuesta inmune, por ello, en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio, el SC se activa y recluta células inmunitarias (neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y mastocitos) en la zona de lesión miocárdica^{74, 75}. Estas células actúan reparando el tejido dañado, eliminando los cardiomiocitos muertos y restos de la MEC, mientras secretan factores de crecimiento y citoquinas que van a inducir la proliferación celular y la síntesis de proteínas de la matriz^{64, 76, 77}. Tras el daño miocárdico, los mastocitos sufren una degranulación en respuesta al SC y ROS, liberándose distintos mediadores inflamatorios almacenados en los gránulos, tales como la histamina, factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante β , TGF- β ; factor de crecimiento para fibroblastos básico, factor de crecimiento endotelial vascular), citoquinas (factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α ; interleucinas, IL) y proteasas (serin endopeptidasas, triptasas y metaloproteinasas)⁷⁷⁻⁷⁹. Entre las moléculas liberadas, una de las que parece tener un papel más complejo en esta respuesta inflamatoria es el

TNF- α . Diversos estudios apuntan a que su expresión puede generar sobre las células efectos citotóxicos o citoprotectores en función de cómo y cuándo se produzca su expresión⁸⁰. Entre los efectos citotóxicos se encuentra el aumento de la apoptosis celular, la supresión de la contractibilidad cardíaca y el estímulo de la síntesis de otras citoquinas y quimiocinas⁸¹⁻⁸⁴. Tras la elevada expresión de citoquinas se produce un aumento en la expresión y actividad de metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9), así como un incremento en la expresión de los péptidos natriuréticos (ANP y BNP) y de proteínas de colágeno tanto en la zona de lesión como en los alrededores. Se inicia así la fase de remodelado crónico y adverso⁸⁵⁻⁸⁷.

Los niveles de expresión elevados del TNF- α , también se han visto asociados con la activación del RAAS^{21, 88-90}, demostrándose la implicación de este sistema en la respuesta inflamatoria. La activación de RAAS se observa de manera sistemática en corazones fibróticos independientemente de la etiología de la cardiomiopatía, favoreciendo el remodelado cardíaco a través de acciones autocrinas y paracrinas⁸⁹⁻⁹¹. Como resultado de su activación, se produce el incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos e infiltración de células inmunitarias, y aumento de ROS y de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, que van a desencadenar la activación de numerosas vías de señalización. Entre éstas, cabe destacar la vía de las Smad como promotora central del proceso de fibrosis, y la participación adicional de vías “*non-Smad*” como Ras/MEK/ERK, TAK1-JNK/p38, JAK/STAT y PI3K/Akt^{92, 93}.

El principal mediador de la activación de estas vías es el TGF- β . TGF- β es una citoquina profibrótica, capaz de estimular los fibroblastos cardiacos para sintetizar colágeno. Diversas investigaciones proponen a este factor como actor esencial en la represión de la respuesta inflamatoria, acción necesaria para la mediación del paso del proceso inflamatorio al fibrótico^{66, 94}.

TGF- β suprime la expresión de citoquinas y quimioquinas por monocitos, macrófagos y células endoteliales (Figura 6), y a su vez promueve la producción de α -actina de músculo liso (α -SMA), marcador de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. TGF- β es, por tanto, considerado uno de los factores responsables de la diferenciación de los fibroblastos a su forma especializada, el miofibroblasto^{95, 96}. Como parte de su acción profibrótica, TGF- β induce la expresión de proteínas de la MEC y promueve la expresión de inhibidores de proteasas, lo que favorece que la cicatriz fibrótica formada se preserve. Además, TGF- β es considerado promotor del proceso de hipertrofia^{66, 97}.

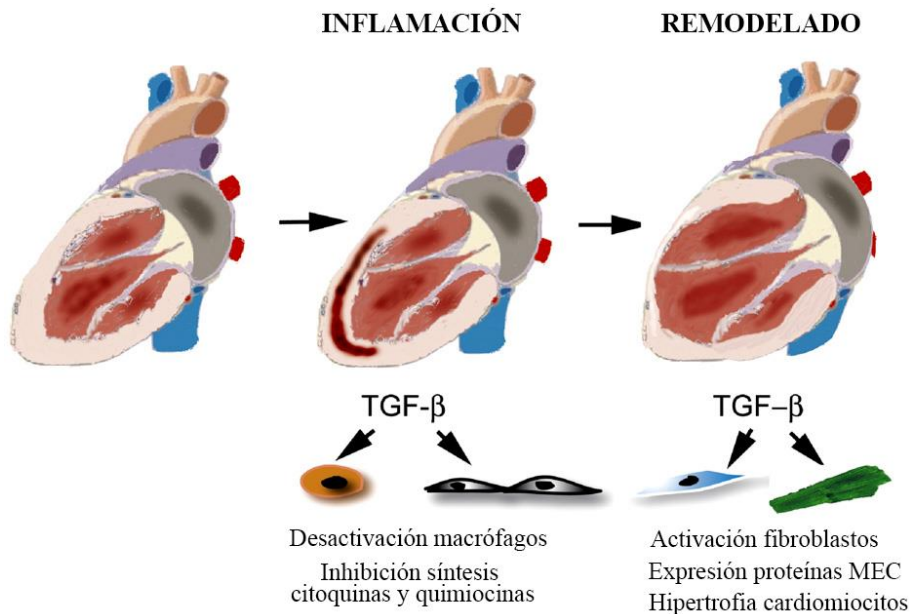


Figura 6. Representación de la mediación del proceso inflamatorio al fibrótico. TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; MEC, matriz extracelular. (Modificada de Bujak, M. et al.⁶⁶).

2.3 Remodelado y fibrosis

Entre los principales procesos manifiestos tras el daño miocárdico encontramos el adelgazamiento de la pared ventricular y la fibrosis cardíaca. En la fase temprana de remodelado, la pérdida de músculo cardíaco intenta compensarse con la hipertrofia de los cardiomiocitos así como con la síntesis de colágeno. El depósito de colágeno en el corazón permite inicialmente proporcionar la fuerza de tensión necesaria para prevenir la ruptura del tejido cardíaco, reemplazando a su vez células apoptóticas y necróticas. Esta reestructuración del tejido permite mantener el *output* cardíaco tras la pérdida de fuerza contráctil. Pero cuando el proceso de remodelado persiste, éste se convierte en

adverso, produciéndose un depósito de colágeno en exceso, lo que va acompañado de un aumento de la masa ventricular y de la rigidez de las cámaras cardíacas, así como de cambios en la geometría del corazón que pasa a ser menos elíptico y más esférico, impidiendo la adecuada contracción y relajación ventricular, lo que produce un descenso del volumen sistólico y disfunción cardíaca^{60, 97, 98} (Figura 7). Además, al separarse los cardiomiocitos con el crecimiento de la MEC, puede dañarse el acoplamiento eléctrico, permitiendo la generación de circuitos de reentrada que promueven las arritmias^{66, 99}. Consecuente a la fibrosis se produce una disminución de la densidad capilar, por lo que la difusión del oxígeno se reduce pudiendo dar lugar a hipoxia y apoptosis de los cardiomiocitos¹⁰⁰.

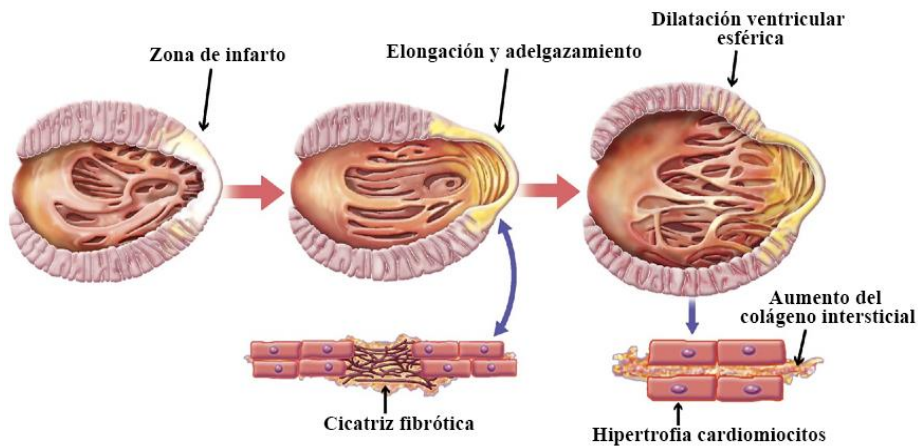


Figura 7. Representación esquemática del remodelado post-infarto. En la fase inicial se produce la cicatriz fibrótica y la elongación y adelgazamiento de la zona infartada, dilatación que junto con el aumento de la apoptosis y la síntesis de colágeno conduce a una morfología ventricular esférica. (Modificada de Konstam, M. A. et al.¹⁰¹).

La fibrosis miocárdica e hipertrofia de los cardiomiocitos es promovida mediante la activación crónica del RAAS^{102, 103}. A través de señales paracrinas y autocrinas el sistema renina-angiotensina-aldosterona incrementa los niveles circulantes de citoquinas y hormonas como la aldosterona, endotelina, vasopresina y AngII, siendo esta última capaz de estimular la expresión del TGF- β a través del receptor de angiotensina tipo I (AT1R) presente en cardiomiocitos y fibroblastos^{104, 105}. Algunos estudios atribuyen al TGF- β una posición central en la mediación del proceso de remodelado cardíaco^{66, 106}, habiéndose observado niveles elevados de esta molécula en las cardiomiopatías dilatada, isquémica e hipertrófica y viéndose más recientemente relacionado con enfermedades valvulares y arrítmicas⁹⁷. Adicionalmente, según Schultz J. *et al.*, la AngII no es capaz de inducir hipertrofia y fibrosis en ausencia del TGF- β , por lo que esta molécula profibrótica es mediador esencial en la señalización *downstream* o cascada abajo del RAAS^{104, 107}. TGF- β es una de las moléculas multifuncionales con mayor pleiotropía conocidas. Ejerce su acción sobre distintos tipos celulares y está implicada en una amplia variedad de procesos biológicos tales como crecimiento y diferenciación celular, proliferación y apoptosis, síntesis de proteínas de la matriz extracelular y desarrollo de la cicatriz fibrótica, y regulación de la respuesta inmune a través de la activación de la migración de neutrófilos, monocitos y fibroblastos^{66, 108, 109} (Figura 8).

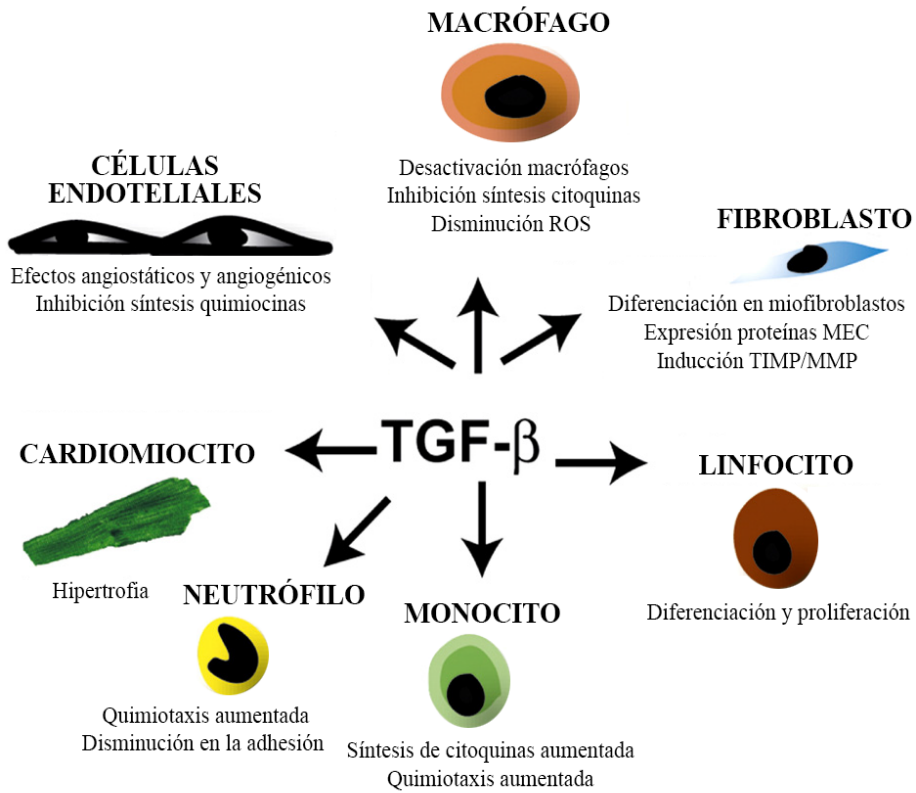


Figura 8. Ejemplo de los efectos pleiotrópicos del TGF-β sobre los principales tipos celulares implicados en el remodelado miocárdico. TGF-β, factor de crecimiento transformante β; ROS, especies reactivas de oxígeno; MEC, matriz extracelular; TIMP, inhibidores de metaloproteinasas; MMP, metaloproteinasas de matriz. (Modificada de Bujak M. et al.⁶⁶).

Hasta el momento se conocen tres isoformas del TGF-β: TGF-β₁, TGF-β₂ y TGF-β₃; aunque la más estudiada es TGF-β₁, cuya expresión puede encontrarse en miofibroblastos, células endoteliales y macrófagos¹¹⁰. TGF-β es secretado en forma latente, formando complejos de unión junto con otras proteínas. Cuando estas proteínas son escindidas (LTBP), TGF-β se activa¹¹¹ (Figura 9).

Síntesis

1. Precursor TGF- β

N-terminal ————— C-terminal

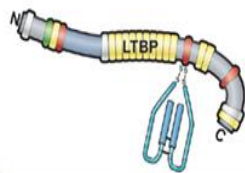
2. Dimerización y escisión



3. Complejo latente pequeño (SLC)



4. Complejo latente grande (LLC)



Secreción

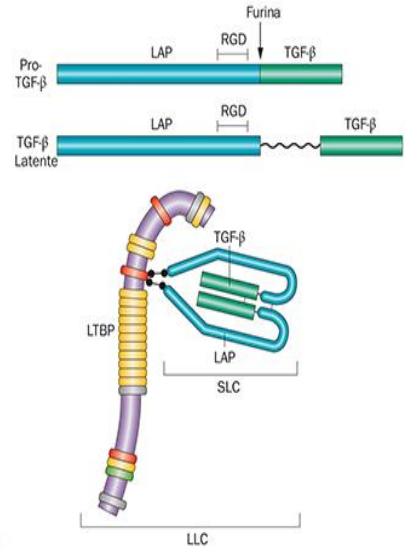
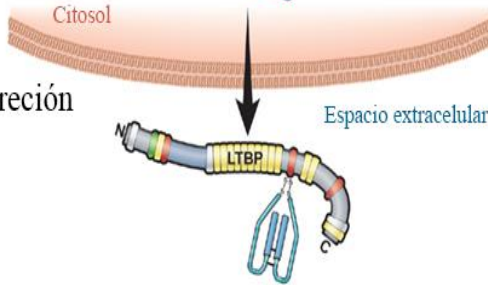


Figura 9. Síntesis y secreción del TGF- β . TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; LTBP, proteína de unión del TGF- β latente; LAP, péptido asociado a la latencia. (Modificada de Hayashi H. *et al.*¹¹²).

Una vez activo, se une al receptor tipo II (TBR2) formando un complejo que interactúa a su vez con el dominio citoplasmático del receptor tipo I (TBR1). Al unirse, se produce la transfosforilación, lo que da lugar a la activación del dominio kinasa del TBR1, iniciándose la transducción de señales, principalmente a través de la fosforilación de la familia de proteínas Smad, que van a actuar como segundos mensajeros del TGF- β ^{66, 113} (Figura 10). Las proteínas Smad pueden

dividirse en tres clases funcionales: receptor-reguladas (R-Smads; Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8), co-mediadoras (Smad4 y Smad10) e inhibidoras (I-Smads; Smad6 y Smad7). Entre las R-Smads, Smad2 y Smad3 median las señales de la familia del TGF- β mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 responden a la familia de BMP o proteína morfogénica ósea^{113, 114}.

El primer paso de la vía TGF- β /Smad es la unión de Smad2 y Smad3 al complejo TGF- β /Receptor, coordinado por la proteína SARA (*Smad anchor for receptor activation*). SARA se une cooperativamente a Smad2 y Smad3 no fosforiladas y al complejo TGF- β /Receptor presentando las Smads al TGF- β RI activado. Una vez fosforilados y activados los agregados R-Smads 2/3 por el TGF- β RI, se disocian de éste y se combinan con Smad4 formando un complejo que, en conjunto con otros cofactores nucleares, es translocado al núcleo donde las proteínas que lo forman van a actuar como factores de transcripción regulando la expresión de determinados genes (genes con elementos de unión SBE/TBE, esto es, *Smad binding elements/TGF- β binding elements*)¹¹⁴⁻¹¹⁶ (Figura 10).

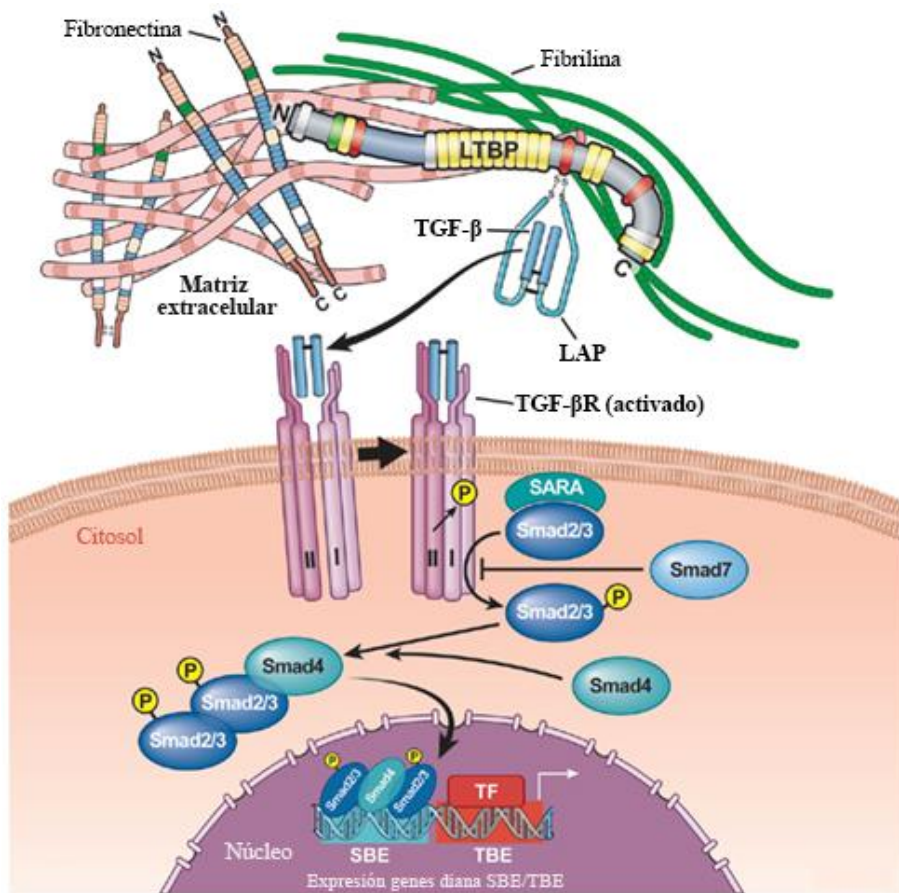


Figura 10. Esquema del mecanismo de activación de la vía de señalización de la familia de proteínas Smad. TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TGF- β R: receptor del factor de crecimiento transformante β ; LTBP, proteína de unión del TGF- β latente; LAP, péptido asociado a la latencia; TF, factor de transcripción. (Modificada de Hayashi H. et al.¹¹²).

Dentro de la familia Smad también encontramos las proteínas Smad 6 y 7, que actúan inhibiendo la activación de las R-Smads por aumento de la degradación del receptor TGF- β RI o por unión competitiva de las I-Smads al mismo, impidiendo en última instancia la fosforilación de las R-Smads¹¹⁴. En la cicatriz fibrótica, estas proteínas se encuentran infra-expresadas¹¹⁷.

Además de la activación de la vía de señalización de la familia Smad, TGF- β activa otras cascadas de señalización Smad-independientes o *non-Smad* (Figura 11), como las vías TAK1-JNK/p38, Ras/MEK/ERK, JAK/STAT y PI3K/Akt^{92, 93}. Así pues, a través de las vías TAK1-JNK/p38 y Ras/MEK/ERK, la expresión continua de TGF- β induce la producción progresiva de colágeno por los miofibroblastos además de respuesta hipertrófica en cardiomiocitos y células musculares lisas vasculares¹¹⁸⁻¹²⁰. Aunque TGF- β puede inducir la activación de estas vías independientemente de la activación de la cascada de las proteínas Smad, ambas actúan de manera conjunta en la regulación *downstream* de las respuestas celulares a TGF- β . Este también es el caso de la regulación del proceso de apoptosis inducido por TGF- β ^{93, 121}.

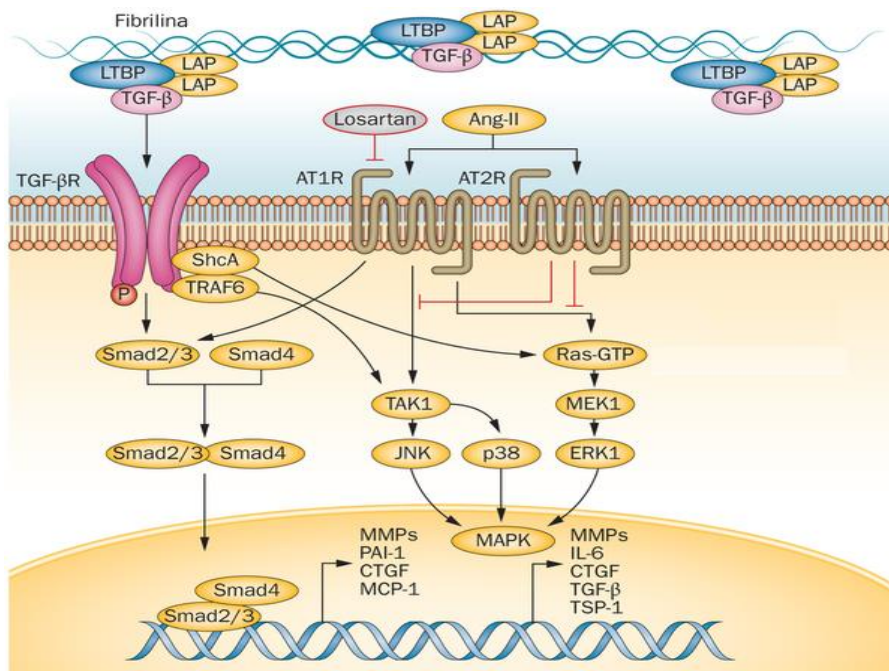


Figura 11. Principales vías de señalización en el proceso de fibrosis y remodelado cardíaco. (Modificada de Levine R. A. et al.¹²²).

De manera similar, la activación constitutiva de la vía JAK/STAT puede dar lugar a la hipertrofia de los cardiomiocitos, mientras que la supresión de la misma está relacionada con apoptosis^{123, 124}. Por otro lado se ha observado que la inactivación de la vía PI3K/Akt reduce la inflamación, fibrosis y disfunción cardíaca, lo que demuestra su implicación en el proceso de remodelado cardíaco¹²⁵. Sin embargo, PI3K/Akt puede antagonizar determinados efectos derivados de la activación de la vía Smad como la detención del ciclo celular asociada al proceso de hipertrofia y la apoptosis. Esta protección de las células se piensa que se produce como resultado de la interacción de Akt con Smad3 impidiendo su fosforilación y translocación al núcleo^{93, 126}.

2.3.1 Matriz extracelular y colágeno

La matriz extracelular cardíaca es una red compleja y dinámica compuesta por proteínas estructurales y no estructurales, que dan fuerza y plasticidad al sistema, así como por proteínas de adhesión y moléculas de señalización. Las proteínas no estructurales son fundamentales para la plasticidad de la matriz y se dividen en tres grandes grupos: glucoproteínas, proteoglucanos y glucosaminoglucanos. Entre las proteínas estructurales se incluyen fibronectina, lamininas, y fundamentalmente proteínas de colágeno, que sirven para dar soporte a cardiomiocitos, miofibroblastos y demás células cardíacas, participando así en la organización y morfología de los tejidos, y contribuyendo a sus propiedades mecánicas. Además, los colágenos son proteínas que a través de interacciones célula-matriz regulan la proliferación, migración y diferenciación celular¹²⁷⁻¹²⁹.

Los colágenos se dividen principalmente en dos grupos: fibrilares y no fibrilares (Tabla 7). Los colágenos no fibrilares a su vez se clasifican en colágenos formadores de redes, colágenos asociados a fibrillas (FACIT; *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*), colágenos asociados a membrana (MACIT; *membrane-associated collagens with interrupted triple helices*), multiplexinas y fibrillas de anclaje⁶⁸.

Tabla 7. Clasificación y distribución de los tipos de colágeno.

| Clase | Tipo | Distribución |
|-----------------------------|---------------|---|
| Fibrilar | I | Corazón, dermis, hueso, ligamento, tendón. |
| | II | Cartílago, h.vítreo. |
| | III | Corazón, intestino, piel, vasos sanguíneos. |
| | V | Corazón, córnea, dermis, hueso, placenta. |
| | XI | Cartílago, disco intervertebral. |
| | XXIV | Córnea, hueso. |
| | XXVII | Cartílago. |
| Formadores de redes | IV | Membrana basal. |
| | VI | Cartílago, corazón, córnea, dermis, hueso. |
| | VIII | Corazón, cerebro, dermis, riñón. |
| | X | Cartílago. |
| FACIT | IX | Cartílago, córnea, h.vítreo. |
| | XII | Dermis, tendón. |
| | XIV | Cartílago, dermis, hueso. |
| | XVI | Dermis, riñón. |
| | XIX | Membrana basal. |
| | XX | Útero, vejiga. |
| | XXI | Estómago, riñón. |
| | XXII | Uniones tisulares. |
| | XXVI | Ovarios, testículos. |
| MACIT | XIII | Células endoteliales, corazón, dermis, ojo. |
| | XVII | Hemidesmosomas epiteliales. |
| | XXIII | Corazón, retina. |
| | XXV | Cerebro, corazón, testículos. |
| Multiplexinas | XV | Capilares, corazón, testículos, riñón. |
| | XVIII | Membrana basal. |
| Fibrillas de anclaje | VII | Dermis, vejiga. |
| — | XXVIII | Dermis. |

(Modificada de Shoulders, M. D. et al.⁶⁸).

Los colágenos constan de tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α , que se organizan sobre sí mismas para formar una triple hélice que puede constituir la mayor parte de su estructura (96% en el colágeno I), o la menor (10% en el colágeno XII). Esta superfamilia de proteínas comprende 28 tipos que, gracias a la existencia de promotores alternativos y al *splicing* alternativo, pueden dar lugar a distintas combinaciones de cadenas polipeptídicas e isoformas, aumentando en gran número la diversidad de formas para un mismo tipo de colágeno. Además, gracias a la escisión proteolítica de determinados colágenos, se liberan pequeños fragmentos conocidos como matricinas. Éstas son capaces por sí mismas de desempeñar actividades biológicas alternativas, ampliando así la diversidad funcional de las moléculas de colágeno¹³⁰. Por otro lado, las interacciones de colágenos con otras proteínas de la matriz, la multimerización, la desnaturalización o la acción de fuerzas mecánicas, pueden inducir cambios conformacionales en las moléculas de colágeno que pueden desenmascarar sitios crípticos que quedarían expuestos a nuevas interacciones¹³¹. En el caso de los colágenos de membrana, la escisión del dominio soluble puede darse como mecanismo de regulación celular¹³².

▪ 2.3.1.1. *Biosíntesis y organización de las moléculas de colágeno*

La biosíntesis de colágeno ha sido estudiada fundamentalmente en colágenos fibrilares. Es un proceso complejo con numerosos pasos intra y extracelulares que van a contribuir a las propiedades biomecánicas y estructurales de las moléculas resultantes¹³³. El primer paso es la síntesis por los ribosomas de las moléculas precursoras denominadas

procadenas α . Éstas, además del péptido señal necesario para su posterior transporte al retículo endoplasmático, presentan aminoácidos adicionales en los extremos amino y carboxilo terminales denominados propéptidos¹³⁴. Una vez las procadenas son importadas al retículo, experimentan una variedad de modificaciones postraduccionales como hidroxilaciones y glucosilaciones¹³⁵, formándose además enlaces intracatenarios que permiten que las procadenas se enrollen entre sí dando lugar a hélices triméricas de procolágeno. Estas hélices de procolágeno son empaquetadas en vesículas de secreción del Golgi y secretadas al espacio extracelular. Tras su secreción, los propéptidos son escindidos por metaloproteinasas¹³⁶, lo que da lugar a moléculas maduras de colágeno que se asocian formando fibrillas (10-300 nm), que se ensamblan para dar lugar a fibras (0,5-3 μm) (Figura 12).

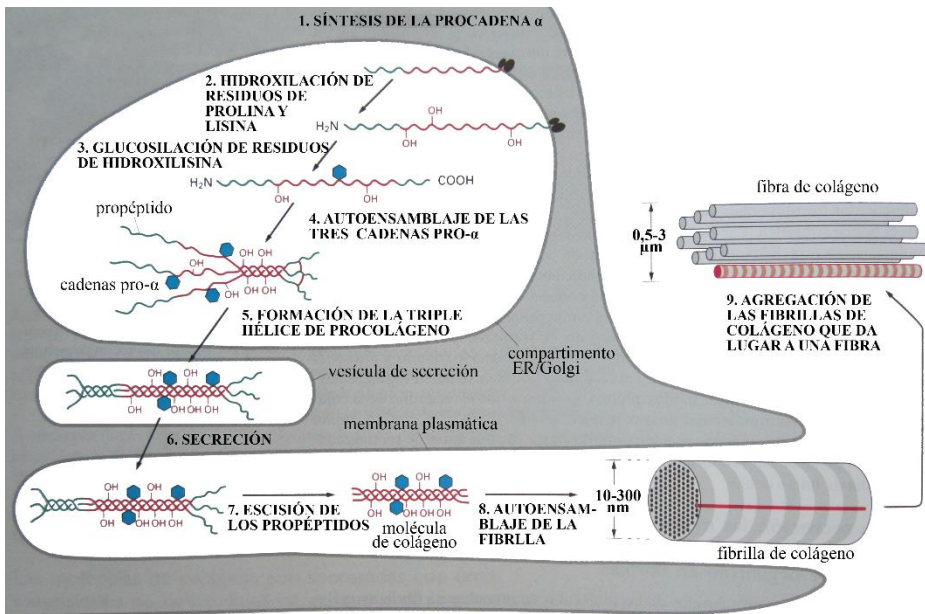


Figura 12. Esquema de la biosíntesis y ensamblaje de las moléculas de colágeno. (Modificada de Alberts et al.¹³⁴).

Estas fibras son estabilizadas por enlaces covalentes, catalizados fundamentalmente por la familia de las lisil oxidasas, proporcionando así resistencia a la tensión y a la tracción¹³⁴. Las lisil oxidasas pueden catalizar enlaces intra- e intermoleculares entre el mismo o distintos tipos de colágenos¹³⁷. Esta formación de enlaces y estabilización de las fibras varía en función del tejido donde se estén produciendo las moléculas de colágeno. Otra forma de reticulación entre los colágenos es la glucosilación avanzada, que se incrementa conforme envejecen los tejidos contribuyendo a la progresiva insolubilización de las moléculas de colágeno y consecuente aumento de la rigidez¹³⁸.

En cuanto a su estructura supramolecular, los colágenos fibrilares contienen un gran dominio triple hélice (Figura 13), mientras que los colágenos no fibrilares contienen varios dominios triple hélice que son interrumpidos por dominios de no colágeno o *non-collagenous* (NC). Éstos, se intercalan entre las triples hélices permitiendo la formación de giros y, a su vez, dando más plasticidad y flexibilidad a la molécula¹³⁹. Los dominios NC, por tanto, tienen un papel principal en el ensamblaje y en la estabilización de redes de colágenos. Además, pueden incluir repeticiones de fibronectina tipo III, así como dominios trombospondina, factor de von Willebrand o Kunitz que pueden participar en interacciones proteína-proteína y aportar mayor diversidad funcional^{133, 139, 140} (Figura 14).

Fibrilares

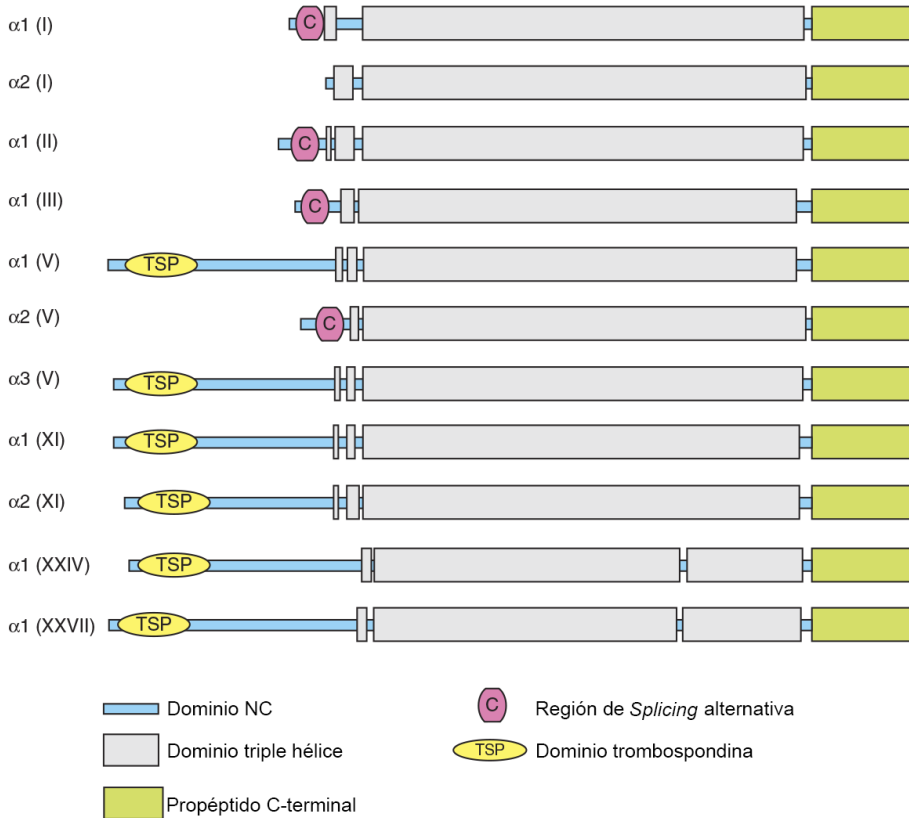
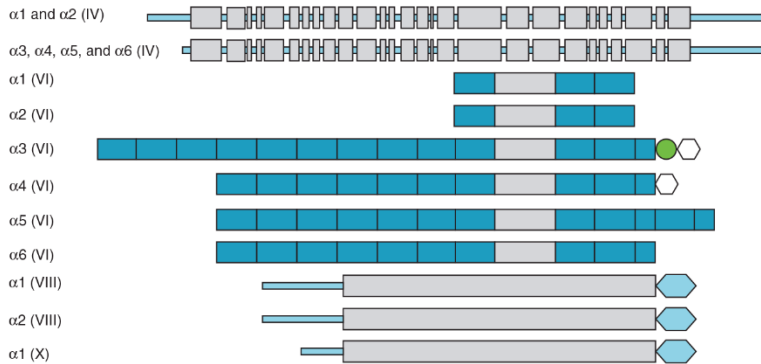


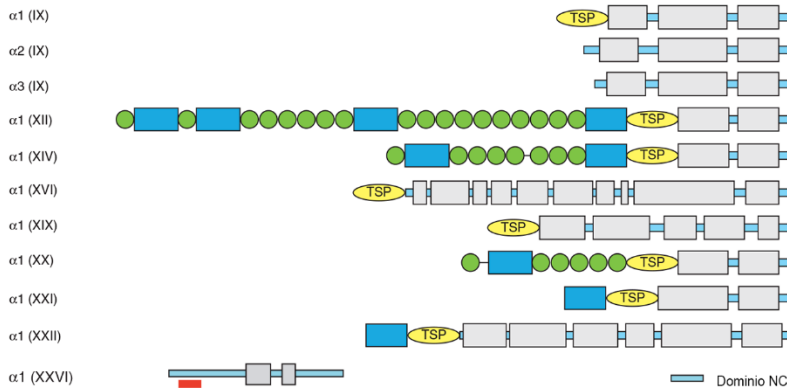
Figura 13. Esquema de la estructura supramolecular de los colágenos fibrilares. NC, *non-collagenous*. (Modificada de Ricard-Blum S. et al.¹³⁰).

Dentro de los colágenos no fibrilares (Figura 14), los FACIT no forman fibrillas por sí solos, sino que se asocian covalentemente a la superficie de fibrillas de otros colágenos fibrilares ayudando a organizar las grandes redes fibrilares¹³⁹. Los colágenos formadores de redes, sin embargo, son capaces de dar lugar a distintos tipos de redes por sí mismos^{140, 141}.

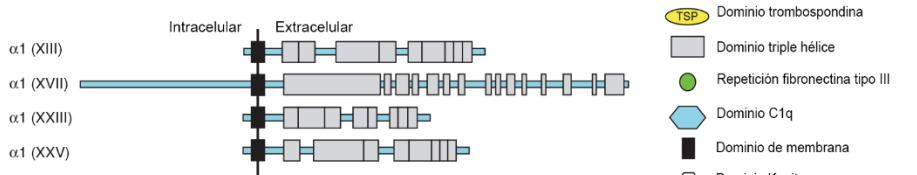
Formadores de redes



FACIT



MACIT



Multiplexinas



Fibrillas de anclaje

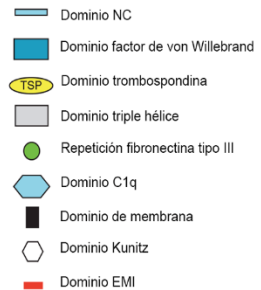


Figura 14. Esquema de la estructura supramolecular de los colágenos no fibrilares. NC, non-collagenous. (Modificada de Ricard-Blum S. et al.¹³⁰).

En cuanto a la clase MACIT, está compuesta por colágenos transmembrana con un dominio intracelular corto, un dominio de membrana y una parte extracelular con dominios triple hélice flanqueados e interrumpidos por dominios NC. La escisión del ectodominio por metaloproteinasas de matriz (MMPs) o convertasas puede darse como mecanismo de regulación celular¹⁴². Las fibrillas de anclaje permiten uniones firmes entre determinadas moléculas y estructuras¹⁴³.

Algunos de estos colágenos no fibrilares pueden encontrarse formando parte de distintos tipos de estructuras moleculares como filamentos de cuentas (colágeno VI), fibrillas de anclaje (colágeno VII), redes (colágenos IV, VIII, X), o asociados a fibrillas (colágenos IX, XIV, XVI)^{141, 144, 145} (Figura 15).

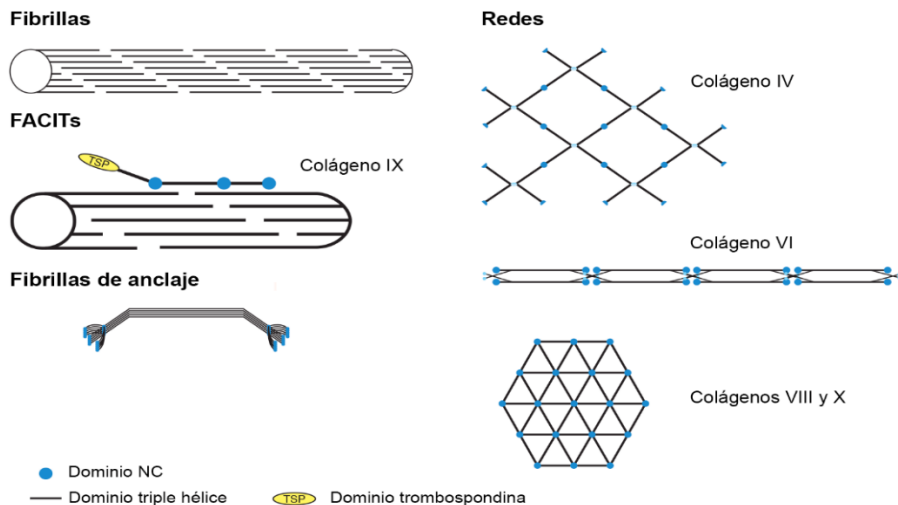


Figura 15. Tipos de organización estructural formadas por las moléculas de colágeno. NC, *non-collagenous*. (Modificada de Ricard-Blum S. et al.¹³⁰).

▪ 2.3.1.2. *Alteraciones del metabolismo del colágeno y remodelado de la matriz extracelular*

La MEC está en íntima asociación con el resto de componentes del miocardio, y por tanto juega un papel crítico en el mantenimiento de la morfología, tamaño y función ventricular. Cambios en su composición y/u organización pueden comprometer la función sistólica y diastólica. Así, el proceso de remodelado que inicialmente ocurre para preservar la estructura del miocardio, puede dar lugar a profundas alteraciones de la matriz, tales como cambios en la reticulación y concentración del colágeno²⁷. Dichos cambios pueden producir acumulación continua de colágeno, desarrollo de fibrosis y rigidez miocárdica^{28, 146}, o bien pueden originar debilitamiento de los enlaces estructurales y aumento de la elasticidad de la matriz, lo que va acompañado de hipertrofia de los miocitos y progresión de la dilatación cardíaca^{147, 148}. Ambas situaciones pueden ocurrir simultáneamente, y resultan en disfunción ventricular.

Las metaloproteinasas e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) participan activamente en el metabolismo del colágeno. El balance entre ambas categorías determinará en gran parte el grado de remodelado de la MEC¹⁴⁹. MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de desnaturalizar y degradar las moléculas de colágeno. Dentro de esta familia, las más conocidas son las colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) y las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). El proceso de degradación de la MEC se inicia por las colagenasas, encargadas de escindir las cadenas α de los colágenos I y III, y es facilitado por las

gelatinasas, que van a degradar componentes de la membrana basal como el colágeno IV¹⁵⁰. Cuando se produce una sobre-expresión de estas moléculas en paralelo a una infra-expresión de los TIMPs, se produce la degradación de colágeno, lo que resulta en dilatación ventricular y adelgazamiento de la pared. Por otro lado, estudios de *Stawowy et al.*¹⁵¹, demuestran que la inducción de la expresión de la MMP-2 a través del TGF- β , facilita la migración de fibroblastos cardiacos, lo que a su vez promueve la producción de proteínas de la MEC (mayoritariamente colágeno) aumentando la fibrosis miocárdica.

2.4 Remodelado e hipertrofia

El remodelado y la hipertrofia cardiaca son característicos de muchas cardiopatías de etiología variable cuyas causas subyacentes incluyen HTA, disfunciones valvulares, infartos de miocardio, etc. En la IC, la hipertrofia ventricular se produce en respuesta a estímulos patológicos tales como sobrecargas de presión y volumen, mutaciones de genes del sarcómero, y/o por activación neurohormonal. En consecuencia, en la respuesta hipertrófica se produce crecimiento de los cardiomiocitos, reordenamientos del sarcómero, angiogénesis, fibrosis y activación de células inmunitarias e inflamatorias. En esta respuesta participan tanto cardiomiocitos como el resto de células que conforman el corazón. Estas células se conocen como no-cardiomiocíticas e incluyen fibroblastos, células vasculares, y células sanguíneas e inflamatorias (Figura 16). La comunicación entre estos tipos celulares es fundamental para el desarrollo de hipertrofia y remodelado cardiaco^{152, 153}.

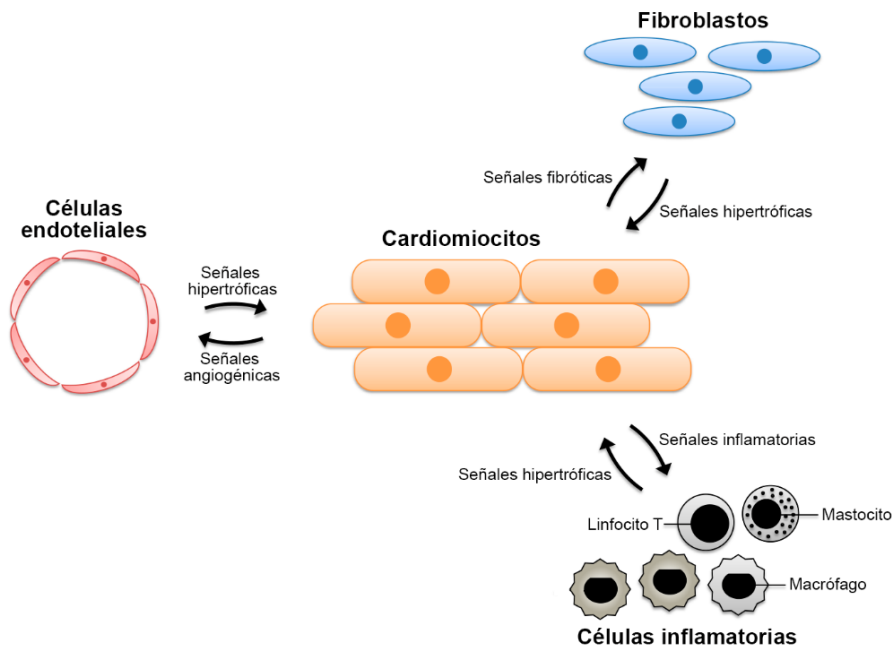


Figura 16. Comunicación intercelular entre cardiomiocitos y células no-cardiomiocíticas durante el desarrollo de hipertrofia y remodelado cardíaco. La activación del RAAS da lugar a efectos proinflamatorios, prohipertroficos y profibróticos a través de factores autocrinos y paracrinos ($\text{TGF-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL) que median la señalización intercelular. Como resultado se produce angiogénesis, proliferación y diferenciación de fibroblastos, y consecuentemente el desarrollo de hipertrofia y fibrosis. (Modificada de Kamo T. et al.¹⁵³).

Diversos estudios apuntan a que la forma predominante de comunicación intercelular es el $\text{TGF-}\beta$, probablemente gracias a que esta molécula se expresa y se libera por muchos tipos celulares entre los que se incluyen cardiomiocitos, fibroblastos y células inmunitarias¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. $\text{TGF-}\beta$ actúa mediando la señalización *downstream* de la AngII modulando el crecimiento celular y la hipertrofia a través de la activación de la vía de las Smad y vías Smad-independientes (TAK1-JNK/p38 y Ras/MEK/ERK , principalmente)^{157, 158}.

A diferencia de la hipertrofia fisiológica, en la señalización intercelular de la respuesta patológica, las señales de crecimiento de cardiomiocitos se acompañan de señales apoptóticas. De manera consecuente, se produce pérdida de tejido contráctil y fibrosis de reemplazo^{152, 159} (Figura 17).

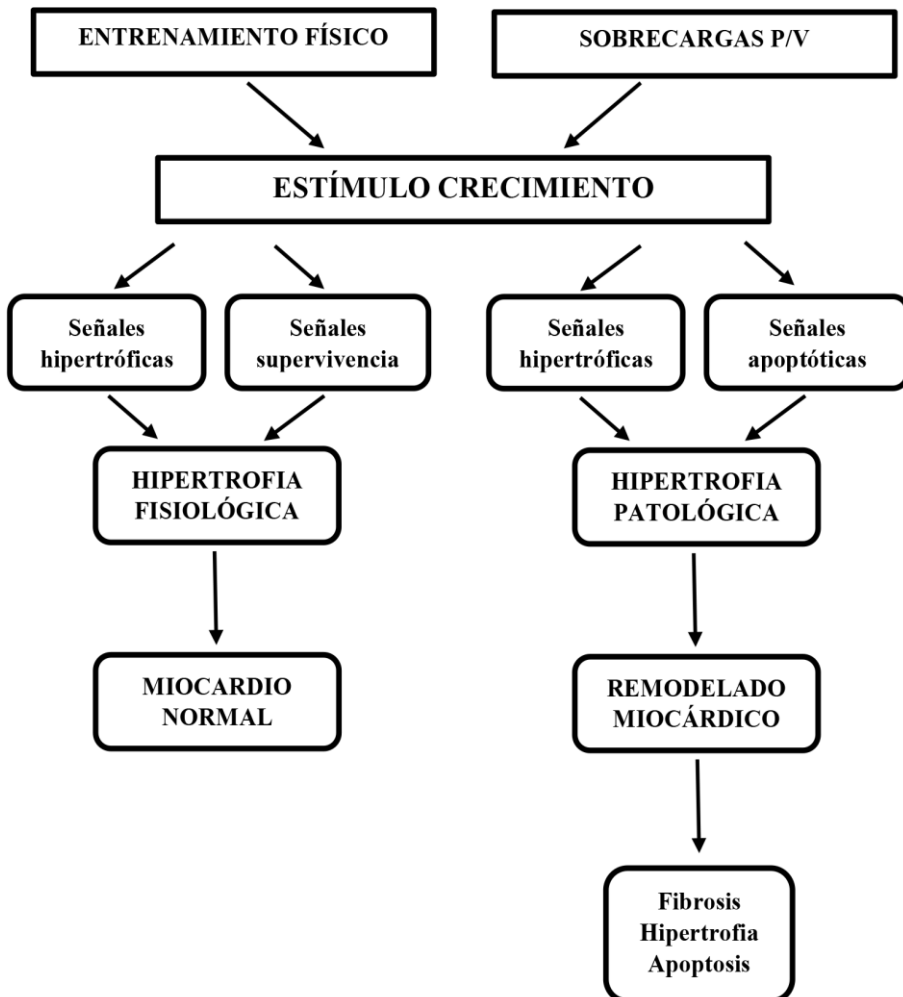


Figura 17. Señalización en la respuesta hipertrofica fisiológica y patológica. P/V = Presión/Volumen. (Modificada de Distefano G. et al.¹⁵⁹).

2.5 Remodelado y apoptosis

La pérdida de cardiomiocitos que tiene lugar durante el desarrollo de la IC es debida en parte a la activación de la vía apoptótica. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que puede activarse por estímulos extracelulares (citoquinas, hormonas, factores vasoactivos como la AngII, etc.) o intracelulares (toxinas, radicales libres, radiación, daños en el ADN, etc.) a través de una ruta extrínseca o intrínseca, respectivamente (Figura 18). Ambas rutas son mediadas por una cascada de activación de la familia de las caspasas, cisteín-proteasas que son activadas de forma secuencial mediante escisión de sus prodominios y que pueden clasificarse como caspasas iniciadoras (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10) o caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7)^{160, 161}.

- Ruta extrínseca: también conocida como ruta Fas Ligando/ Receptor. La unión del ligando Fas (FasL) al receptor de muerte celular Fas (FasR) activa el dominio intracelular del receptor (DD, *Death Domain*), momento en el que es capaz de reclutar el adaptador FADD (*Fas associated Death Domain-containing protein*) a través de interacciones DD-DD. Este adaptador lleva unido a uno de sus extremos la procaspasa iniciadora. FasR, FADD y la procaspasa iniciadora forman el complejo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), y su formación da lugar a la activación de la propia procaspasa. La caspasa iniciadora a su vez puede activar la muerte celular por apoptosis, bien de forma directa a través de la activación de las caspasas efectoras

(caspasa-3), o bien a través de la ruta intrínseca por escisión y formación de tBID (*truncated BH3 interacting-domain death agonist*) y posterior activación de la familia Bcl-2^{162, 163}.

- Ruta intrínseca: su activación se inicia por proteínas de la familia Bcl-2 que permeabilizan selectivamente las membranas mitocondriales externas permitiendo la difusión del citocromo c desde la cadena respiratoria hacia el citosol, lo que activará a la proteasa Apaf-1 que a su vez recluta a la procaspasa 9 formando el apoptosoma en presencia de dATP (desoxiadenosina trifosfato). La formación de este complejo activará a caspasas efectoras (caspasa-3) produciéndose la muerte celular por apoptosis^{161, 162}.

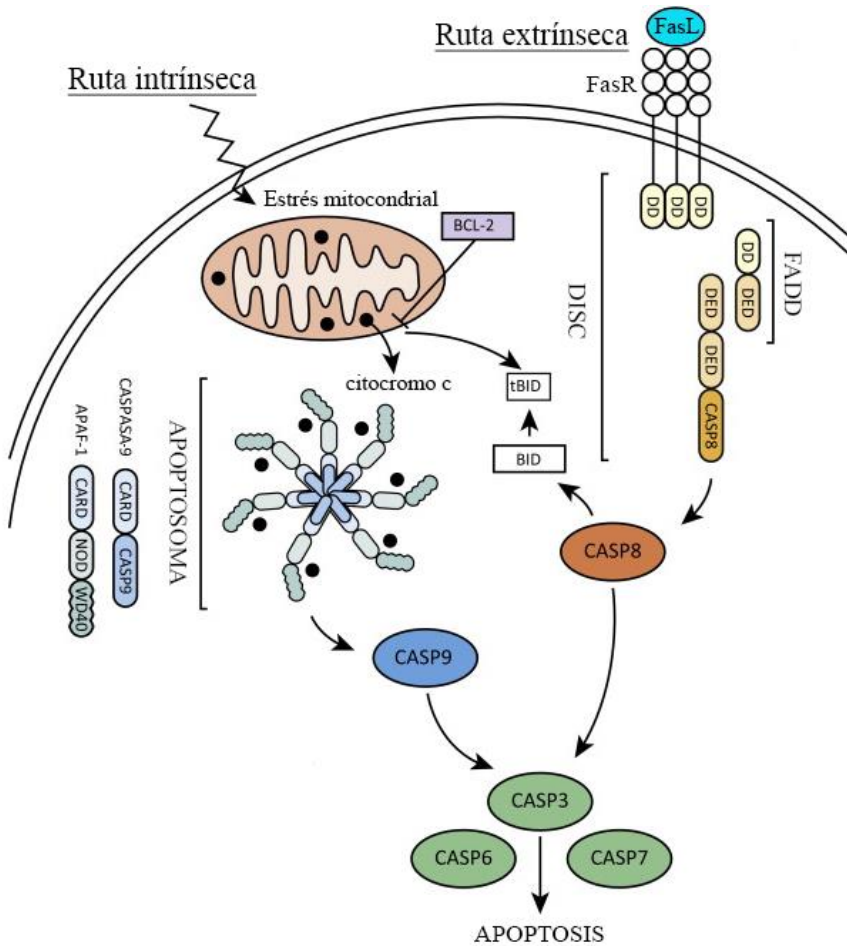


Figura 18. Esquema del proceso de apoptosis por las rutas extrínseca e intrínseca. La ruta extrínseca es iniciada por la unión del ligando Fas (FasL) al receptor de muerte celular (FasR). La ruta intrínseca es iniciada por proteínas de la familia Bcl-2. (Modificada de Creagh E.M. et al.¹⁶²).

Debido a que la apoptosis es un proceso dependiente de energía, la falta de ATP puede inhibir las últimas etapas del proceso apoptótico. Es lo que se conoce como *apoptosis interruptus* y los cardiomiocitos que sufren este proceso reciben el nombre de miocitos zombies (*zombie*

myocytes). En este caso, puede producirse muerte celular por un proceso de necrosis secundaria^{164, 165}.

Varias investigaciones en modelos animales han observado una relación entre hipertrofia y apoptosis concluyendo que la progresiva pérdida de cardiomiocitos por apoptosis puede dar lugar por sí misma al desarrollo de MCD^{166, 167}. Por otro lado, la muerte de cardiomiocitos también puede ser resultado de un proceso de necrosis consecuencia del propio proceso hipertrófico. La hipótesis que relaciona ambos mecanismos se basa en la formación de un “núcleo isquémico” en los cardiomiocitos hipertróficos. El aumento del área del miocito como resultado de la hipertrofia impediría la llegada de oxígeno por difusión al centro de la célula, produciéndose el estrés de las mitocondrias centrales que conformarían el núcleo isquémico. La disminución en la generación de ATP predispondría a la célula a iniciar la vía necrótica¹⁶¹. El número de estudios que relacionan la hipertrofia con la disminución del aporte de oxígeno a los cardiomiocitos aumenta progresivamente^{168, 169}. De esta manera, el desarrollo de hipertrofia daría lugar a una disminución de la densidad capilar que a su vez produciría muerte celular por apoptosis y necrosis, y consecuentemente fibrosis de reemplazo, que progresivamente conduciría al desarrollo de remodelado ventricular izquierdo y fallo cardíaco.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Tras la lesión cardíaca, la constante activación de los mecanismos de compensación puede dar lugar a un proceso de remodelado adverso que conducirá a un deterioro progresivo de la función ventricular y desarrollo de IC. Durante la fase de remodelado, la pérdida de músculo cardíaco intenta compensarse con la hipertrofia de los cardiomiocitos así como con la síntesis de colágeno. Este depósito de colágeno permite inicialmente proporcionar la fuerza de tensión necesaria para prevenir la ruptura del tejido cardíaco, pudiendo mantener en primera instancia el gasto cardíaco tras la pérdida de fuerza contráctil. Pero el depósito de colágeno en exceso produce un aumento de la rigidez de las cámaras cardíacas y en la masa ventricular, así como cambios en la geometría cardíaca, produciéndose daños en el acoplamiento eléctrico que promueven las arritmias, y disfunción cardíaca. Además, de manera consecuente a los procesos de fibrosis e hipertrofia, se produce una disminución en la difusión del oxígeno desencadenando situaciones de hipoxia y apoptosis de los cardiomiocitos.

Teniendo en cuenta lo anterior, nuestra hipótesis de partida es que vinculado al proceso de remodelado adverso, podría existir una alteración en la expresión de los genes que codifican proteínas de colágeno, y que podrían estar participando de forma crucial en el desarrollo de fibrosis miocárdica, remodelado cardíaco y disfunción ventricular.

Analizando una cohorte de pacientes diagnosticados de IC de etiologías isquémica y dilatada con clase funcional III-IV, y un grupo de sujetos control sin enfermedad cardiaca, se pretende confirmar la hipótesis de esta tesis doctoral mediante los siguientes objetivos:

1. Estudiar la fibrosis miocárdica y el remodelado cardiaco en muestras de tejido de VI de pacientes con MCI y MCD, a través del análisis del perfil de expresión génica de los colágenos obtenido mediante la tecnología de alta sensibilidad de secuenciación de ARN.
2. Validar los posibles cambios de expresión génica obtenidos en la secuenciación de ARN mediante *PCR* cuantitativa en tiempo real. Analizar los niveles de proteínas de los genes encontrados diferencialmente expresados en nuestro grupo de pacientes.
3. Estudiar la relevancia de los posibles cambios de la expresión génica de los colágenos en pacientes con MCI y MCD mediante el análisis del perfil de expresión de establecidos marcadores moleculares de los procesos de fibrosis, hipertrofia y apoptosis, así como mediante el estudio de las relaciones entre los genes diferencialmente expresados y los marcadores moleculares establecidos, y con los parámetros de función y remodelado ventricular izquierdo.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. COLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron a partir de corazones explantados de pacientes con MCI y MCD sometidos a trasplante cardiaco en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, y de corazones control (CNT).

Los pacientes fueron diagnosticados de IC siguiendo los criterios de la ESC y la AHA, y fueron sometidos a un estudio pretrasplante en el servicio de cardiología del hospital en el que se incluyeron pruebas bioquímicas y hematológicas, radiografías de tórax, electrocardiogramas, estudios eco-Doppler y hemodinámicos, así como angiografías coronarias. Los antecedentes clínicos de los pacientes (fecha diagnóstico de IC, eventos cardiacos previos, comorbilidades, etc.) se recogieron en su historia clínica.

La etiología de cada paciente se estableció de acuerdo al consenso establecido entre la *WHO* y la Federación Mundial de la Salud –*World Health Federation*– para la definición de las miocardiopatías ¹⁴. Se consideró MCI cuando se habían documentado episodios previos de infarto agudo de miocardio, cuando la ecocardiografía mostraba segmentos de contractibilidad normales coexistiendo con otros disquinéticos o aquinéticos, y el ECG mostraba signos de isquemia o necrosis miocárdica. Se consideró MCD no isquémica cuando no habían documentados episodios de angina de pecho o infarto de miocardio, y sin embargo poseían disfunción sistólica del VI ($FE < 40\%$) con dilatación hipertrófica no concéntrica (diámetro telediastólico del VI [DTDVI] > 55 mm) demostrada mediante

ecocardiografía, y cuando el ECG no mostró signos de necrosis miocárdica y las coronarias eran normales en la angiografía coronaria. Todos los pacientes fueron sometidos a pruebas de esfuerzo y clasificados funcionalmente de acuerdo a los criterios de la *NYHA*, y seguían un tratamiento médico según las recomendaciones establecidas por la ESC¹⁷⁰. Los pacientes con enfermedad valvular primaria o historia familiar de MCD fueron excluidos del estudio.

Todos los donantes CNT tenían función ventricular normal ($FE > 50\%$), determinada por eco-Doppler, y carecían de antecedentes de enfermedad cardíaca o infección activa en el momento de la obtención de la muestra. Estas muestras se obtuvieron de corazones de donantes que no fueron aptos para trasplante por incompatibilidad sanguínea o de tamaño, y por la imposibilidad de encontrar un nuevo receptor durante el período establecido por el programa de trasplantes. Para este grupo, la causa de muerte fue accidente cerebrovascular (68%) o accidente de tráfico (32%).

Las muestras de tejido cardíaco se obtuvieron en quirófano durante el procedimiento de trasplante con el fin de reducir el tiempo entre la recepción y el almacenaje de las mismas, mejorando la calidad del material de partida. Mediante el uso de tijeras quirúrgicas se cortaron fragmentos de aproximadamente 5 cm^2 de la zona del ápex del VI que se preservaron en NaCl 0,9% y a 4°C por un período máximo de 6 horas desde la pérdida de circulación sanguínea hasta su procesamiento y almacenaje a -80°C . El procesamiento de las muestras se realizó en suero fisiológico y en hielo, se eliminaron las capas más externas (epicardio

y músculos papilares del endocardio) quedándonos con la parte media del endocardio, o miocardio, que se troceó en fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ que fueron lavados con suero y almacenados en criotubos a -80°C hasta su posterior uso (Figura 1).

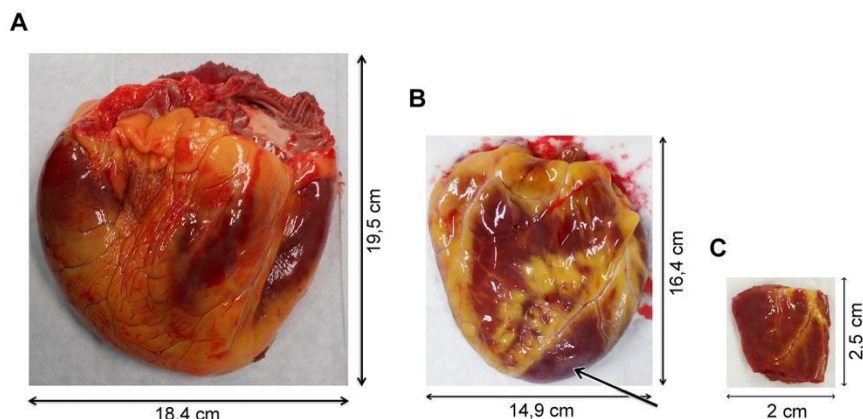


Figura 1. Imágenes de corazones con miocardiopatía dilatada (A) y miocardiopatía isquémica (B) inmediatamente posteriores al explante. (C) Tamaño de la muestra recogida de la zona del ápex del ventrículo izquierdo. La flecha señala la zona miocárdica apical anterior infartada.

El estudio aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, se desarrolló de acuerdo a las directrices para las buenas prácticas clínicas y normas éticas recogidas en la Declaración de Helsinki¹⁷¹. Antes de la obtención de cada muestra, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente o de familiares en el caso de los donantes CNT.

Fueron obtenidas un total de 66 muestras cardíacas, 28 de pacientes con MCD, 28 de pacientes con MCI y 10 muestras CNT. De estas 66 muestras, se utilizaron 36 (MCI = 13, MCD = 13, CNT = 10) para el

estudio de secuenciación de ARN. Para mejorar la potencia estadística del estudio, aumentamos el tamaño muestral para los análisis de expresión génica por *PCR* cuantitativa en tiempo real (*RT-qPCR*) a 46 muestras (MCI = 18, MCD = 18, CNT = 10) y a 66 muestras para los análisis proteicos por *western blot* (MCI = 28, MCD = 28, CNT = 10). El grupo CNT estuvo formado mayoritariamente por varones (80%) con una media de edad de 47 ± 16 años. Los datos ecocardiográficos de este grupo de donantes control, así como sus respectivas comorbilidades no fueron facilitados debido a la ley orgánica española de protección de datos 15/1999.

2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR SECUENCIACIÓN DE ARN

Comprender el transcriptoma es esencial para conocer e interpretar los elementos funcionales del genoma, así como para determinar patrones de expresión génica en los diversos tipos celulares y tisulares, de cuya comparación puede obtenerse información relevante sobre distintas propiedades o comportamientos celulares entre individuos sanos y enfermos. La secuenciación de ARN (*RNA-seq*), es un método de secuenciación aleatoria (*shotgun sequencing*) que utiliza técnicas de secuenciación de nueva generación como la secuenciación por síntesis de Illumina, la pirosecuenciación 454 de Roche, o la secuenciación por ligación de SOLiD. *RNA-seq* permite caracterizar y cuantificar el total de transcritos tales como ARNm, ARNt, ARNr, ARNi, y otros ARN no codificantes, de una célula, tejido u organismo en un momento concreto, en una etapa del desarrollo determinado y bajo unas condiciones fisiológicas específicas. Además, es capaz de identificar sitios de inicio de la transcripción o *TSS*, procesos de fusión génica, eventos de *splicing* alternativo, o polimorfismos *SNP*^{172, 173}. A diferencia de la técnica de microarrays, *RNA-seq* no requiere información previa del genoma de estudio, proporciona una mayor cobertura de bases de secuencia, y muestra una elevada reproducibilidad. Sin embargo, es una técnica más costosa¹⁷³.

Para el proceso de *RNA-seq*, de manera previa a la secuenciación ha de prepararse una librería del transcriptoma completo. La etapa más crítica durante la preparación de la librería es la obtención de ARNm de

alta calidad. La abundancia de algunos tipos de ARN, como el ARNr que puede comprender hasta el 80% del ARN total, puede reducir la cobertura de secuencia disminuyendo así la detección de otros tipos de ARN menos abundantes. Por esta razón, previamente a la secuenciación se utilizan kits comerciales específicos para capturar ARN poli(A) u otros métodos de hibridación o degradación enzimática que enriquecen la muestra en ARNm (Figura 2).

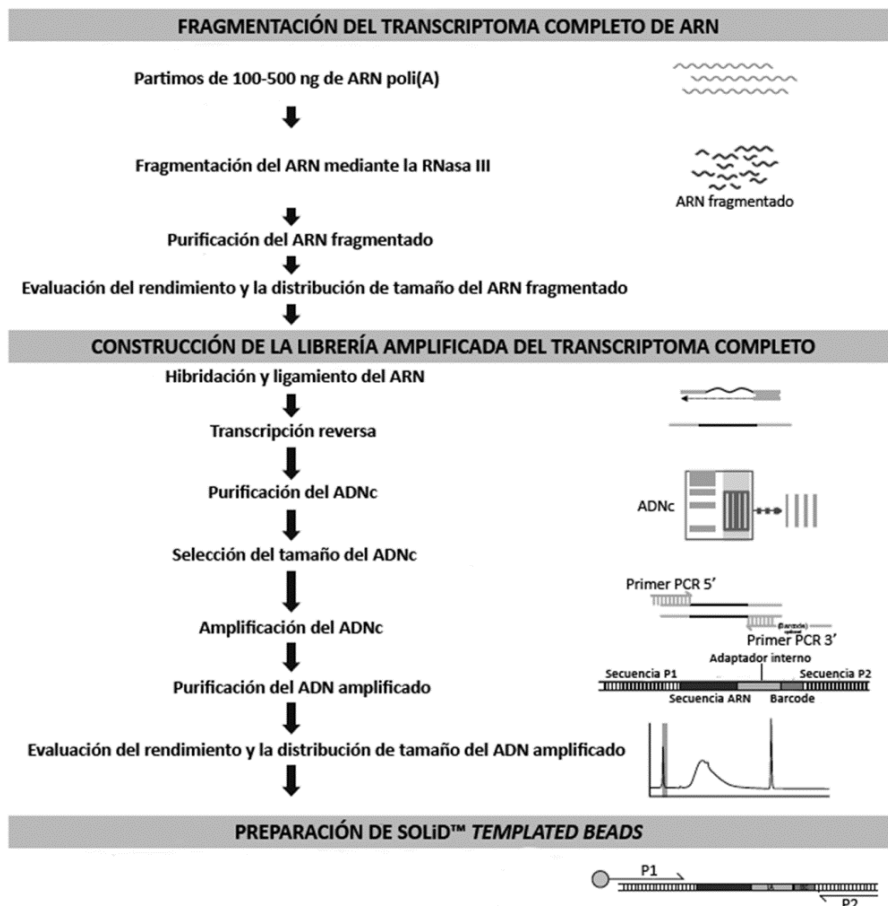


Figura 2. Esquema de la fragmentación y construcción de la librería del transcriptoma completo. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

2.1 Extracción de ARN total y aislamiento de ARN poli(A)

Para la extracción total de ARN se partió de fracciones de aproximadamente 25 mg de las muestras de VI, previamente almacenadas a -80°C . La homogeneización del tejido se llevó a cabo con el ensayo comercial *Tri® Reagent* (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando el homogeneizador *TissueLyser LT* (Qiagen) con bolas de tungsteno de 3 mm.

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit *PureLink™ RNA* (Ambion, Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar se añadió etanol 70% en relación 1:1, se mezcló por inversión, y se pasó todo el volumen por columnas *spin Cartridge* que contienen una membrana de sílice a la que se adhiere el ARN. Cada columna se lavó con 700 μl de tampón de lavado I y dos veces más con 500 μl de tampón de lavado II para eliminar cualquier impureza. Finalmente, el ARN se eluyó con 35 μl de agua libre de RNasas y se evaluó su concentración mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific), y su pureza e integridad mediante una plataforma *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) con el kit *RNA 6000 Nano LabChip®*. Todas las muestras utilizadas en el estudio presentaron una proporción 260/280 mayor de 2,0 y alcanzaron un *RIN* (*RNA integrity number*) ≥ 9 (Figura 3). Tras la evaluación de la calidad del ARN, las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

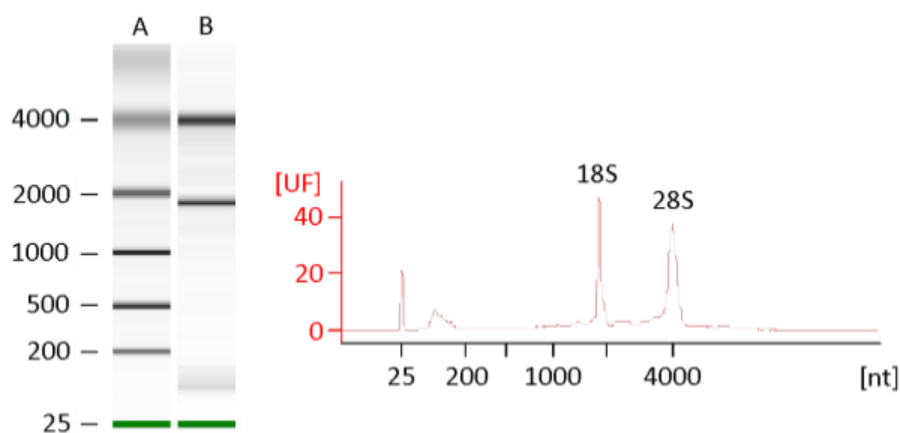


Figura 3. Calidad del ARN de una muestra con $RIN > 9$. El ejemplo muestra el gel del ARN (izquierda) con el marcador (A) y la muestra (B); y su correspondiente electroferograma (derecha), donde se observan los picos de las subunidades ribosómicas 18S y 28S. UF, unidades de fluorescencia; nt, nucleótidos.

El ARN Poli(A) se aisló partiendo de 25 μ g de ARN total utilizando el kit *MicroPoly(A) Purist™* (Ambion, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, cada muestra de ARN se transfirió a un tubo con una celulosa de oligo(dT) que se mezcló por inversión hasta resuspender completamente la resina. A continuación, se calentó la mezcla durante 5 minutos a 65°C para la desnaturalización de la estructura secundaria del ARN, maximizando así la hibridación entre las secuencias poli(A) del ARN y las secuencias poli(T) de la resina. Para facilitar la unión, los tubos se incubaron en balanceo constante a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se precipitó la resina y se lavó para eliminar la muestra no unida específicamente a la resina, principalmente ARNr.

Finalmente, se recuperó el ARN poli(A) con una solución de almacenamiento previamente calentada a 70°C. Este ARN se precipitó con acetato de amonio 5 M, glucógeno y etanol 100%, se lavó con etanol y se resuspendió en nueva solución de almacenamiento. El ARN poli(A) se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

2.2 Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN

2.2.1 Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III

Para la construcción de la librería de ADN complementario (ADNc) para su secuenciación con la plataforma *SOLiD*TM, es necesario un proceso previo de fragmentación del ARN poli(A) y posterior purificación del ARN fragmentado. Para ello, partiendo de 100-500 ng de ARN poli(A), se preparó a 4°C una reacción para cada muestra con 1 µl de tampón *RNase III* 10x, 1 µl de *RNase III* y agua libre de nucleasas hasta completar los 10 µl. Esta reacción se incubó en un termociclador a 37°C durante 10 minutos. Inmediatamente después de la incubación se añadieron 90 µl de agua libre de nucleasas. La digestión con *RNase III* deja grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo libres en los fragmentos de ARN poli(A) resultantes, lo que permitirá la posterior hibridación y ligación del ARN.

Esta fragmentación facilitará y dará robustez al análisis integral del transcriptoma del sistema *SOLiD*TM.

2.2.2 Purificación del ARN fragmentado

El ARN fragmentado se mantuvo a 4°C y, en el tiempo máximo de una hora, se purificó usando el *RiboMinus™ Concentration Module* (Invitrogen). Este producto enriquece todo el espectro de transcritos de ARN por eliminación de ARNr, llegando a eliminar el 95-98% de las moléculas de ARNr que permanecen en la muestra. Para purificar el ARN se añadieron 100 µl de tampón *Binding* y 250 µl de etanol 100%. A continuación la muestra se cargó en una columna y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. Mientras el ARN queda unido a la membrana de sílice de la columna, las impurezas son eliminadas con 500 µl de tampón de lavado con etanol 100% (1:4) previamente preparado y almacenado a temperatura ambiente. La columna se centrifugó a 12.000 g durante un minuto y se volvió a centrifugar a máxima velocidad (25.000 g) para eliminar cualquier residuo de tampón de lavado. Por último, se colocó la columna en un tubo de recuperación estéril y se añadieron 12 µl de agua libre de RNasas para la elución del ARN poli(A) tras la centrifugación de la columna durante 1 minuto a máxima velocidad.

2.2.3 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ARN fragmentado

La evaluación del rendimiento del ARN fragmentado se llevó a cabo mediante el kit *Quant-iT™ RNA Assay* en el *Qubit® Fluorometer* (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Para evaluar la distribución de tamaño del ARN fragmentado se diluyó 1µl de la muestra (1:10) con agua libre de nucleasas y se analizó en el

bioanalizador *Agilent 2100* con el kit *RNA 6000 Pico Chip*. Se utilizó el software *2100 expert* para examinar la distribución del tamaño. Para poder proceder a la construcción de la librería debemos partir de una concentración ≥ 50 ng de ARN poli(A) y, ≥ 100 ng de ARN total empobrecido en ARNr o ≥ 100 ng de ARN control, en 3 μ l de ARN fragmentado. En el caso contrario la muestra se debe concentrar en una centrifuga de vacío.

2.3 Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo

2.3.1 Hibridación y ligación del ARN fragmentado

El primer paso para la construcción de la librería es la hibridación y ligación del ARN (Figura 2). Se transfirieron 5 μ l de tampón de hibridación (2 μ l de *SOLiD™ Adaptor Mix* y 3 μ l de solución de hibridación) a 3 μ l de cada muestra de ARN fragmentado y se incubaron en un termociclador en un único ciclo de 65°C durante 10 minutos y 16°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron los reactivos de ligación de ARN (10 μ l de tampón de ligación 2x y 2 μ l del *mix* de la enzima de ligación), y se incubaron las reacciones en un termociclador a 16°C durante 16 horas.

2.3.2 Transcripción reversa

Para llevar a cabo la transcripción reversa se preparó para cada muestra de ARN ligado obtenido previamente un *mix* con 11 μ l de agua libre de nucleasas, 4 μ l de tampón RT 10x, 2 μ l de *dNTP Mix* y 2 μ l de *SOLiD™ RT Primer*. Las reacciones se incubaron en un termociclador a 70°C

durante 5 minutos y se enfriaron en hielo. A continuación, se añadió 1 μ l de la transcriptasa reversa *ArrayScript*[™] a cada reacción y se volvieron a incubar en un termociclador a 42°C durante 30 minutos.

2.3.3 Purificación del ADNc

El ADNc obtenido en el paso anterior se purificó mediante el kit *MinElute® PCR Purification (Qiagen)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se transfirió todo el ADNc a un tubo *eppendorf* de 1,5 ml y se añadieron 60 μ l de agua libre de nucleasas y 500 μ l de tampón PB. Se pasó el ADNc por una columna *MinElute* y se centrifugó a 13.000 g durante 1 minuto. Tras la centrifugación de la columna, se lavó el ADNc con 750 μ l de tampón PE y se eluyó con 10 μ l de tampón EB.

2.3.4 Selección del tamaño del ADNc

Para seleccionar el tamaño del ADNc se realizó una electroforesis con el sistema *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis (Invitrogen)*. Se cogió 5 μ l de cada muestra de ADNc y se mezcló con 5 μ l de *2x Novex TBE-Urea Sample Buffer*. Se procedió de la misma manera con el marcador *50 pb DNA ladder* previamente diluido a 40 ng/ μ l. Todos los tubos se calentaron en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*) a 95°C durante 3 minutos. Los geles *Novex® 6% TBE-Urea* se insertaron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) con tampón de electroforesis TBE 1x (*5x Novex® TBE Running Buffer, Invitrogen*), y se cargó cada muestra (10 μ l) en sus correspondientes pocillos. La electroforesis se realizó a 180 V durante 25 minutos y a temperatura ambiente.

Los geles resultantes se tiñeron durante 5-10 minutos con *SYBR® Gold*, se cortó en cada uno de ellos la región que contenía el ADNc de 150-250 nucleótidos y se transfirió a tubos de 0,2 ml. *SYBR® Gold* es una tinción alternativa al bromuro de etidio menos tóxica y mucho más sensible (tasa de emisión de fluorescencia > 1000 veces) para la detección de ADN o ARN de simple o doble cadena en geles electroforéticos utilizando un transiluminador ultravioleta estándar.

2.3.5 Amplificación del ADNc

Para la amplificación del ADNc se preparó un *mix* para cada región de gel recortada con 10 µl de tampón de *PCR* 10x, 8 µl de *dNTP Mix*, 2 µl de *SOLiD™ 5' PCR Primer*, 1,2 µl de ADN polimerasa *AmpliTaq®* y 76,8 µl de agua libre de nucleasas. Una vez transferido el *mix* a los tubos de 0,2 ml con cada fragmento de gel, se añadieron 2 µl de *SOLiD™ 3' PCR Primer*. Las reacciones de *PCR* se llevaron a cabo en un termociclador siguiendo el programa especificado en la Tabla 1.

Tabla 1. Amplificación del ADNc.

| Etapa | | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| Desnaturalización inicial | | 95°C | 5 minutos |
| 15 ciclos | Desnaturalización | 95°C | 30 segundos |
| | Hibridación | 62°C | 30 segundos |
| | Extensión | 72°C | 30 segundos |
| Extensión final | | 72°C | 7 minutos |

2.3.6 Purificación del ADN amplificado

A cada reacción de *PCR* resultante se añadió 800 µl de tampón de unión y se procedió a la purificación del ADN amplificado con el *kit PureLink™ PCR Micro kit (Invitrogen)* según las recomendaciones del fabricante. Se cargó cada muestra en las columnas del kit y se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto. A continuación, se lavó el ADN con 600 µl de tampón de lavado y se eluyó en dos pasos con 10 µl de tampón de elución cada vez.

2.3.7 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ADN amplificado

La concentración de ADN purificado se evaluó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)*. En los casos necesarios se diluyó el DNA a < 50 ng/µl con el kit *DNA 1000 (Agilent)* para una cuantificación precisa. Se evaluó el rendimiento y la distribución de tamaño del ADN amplificado usando una plataforma *2100 Bioanalyzer* con el kit *DNA 1000 (Agilent Technologies)* y el software *2100 expert*, calculando el porcentaje de ADN de 25-200 pares de bases y determinando el tamaño medio y la concentración molar de la librería de ADNc.

2.4 PCR de emulsión

2.4.1 Preparación de la reacción de PCR de emulsión

El objetivo de la *PCR* de emulsión (*ePCR*) es generar un gran número de copias de la librería de ADNc construida previamente y, así, aumentar la sensibilidad de la secuenciación. Las emulsiones o

microcámaras de reacción se componen de una fase oleosa que contiene emulsionantes, y una fase acuosa que contiene los componentes de la PCR (fragmentos de ADNc o *templates*, cebadores o *primers* P1 y P2, ADN polimerasa y SOLiD™ P1 DNA Beads) (Figura 4).

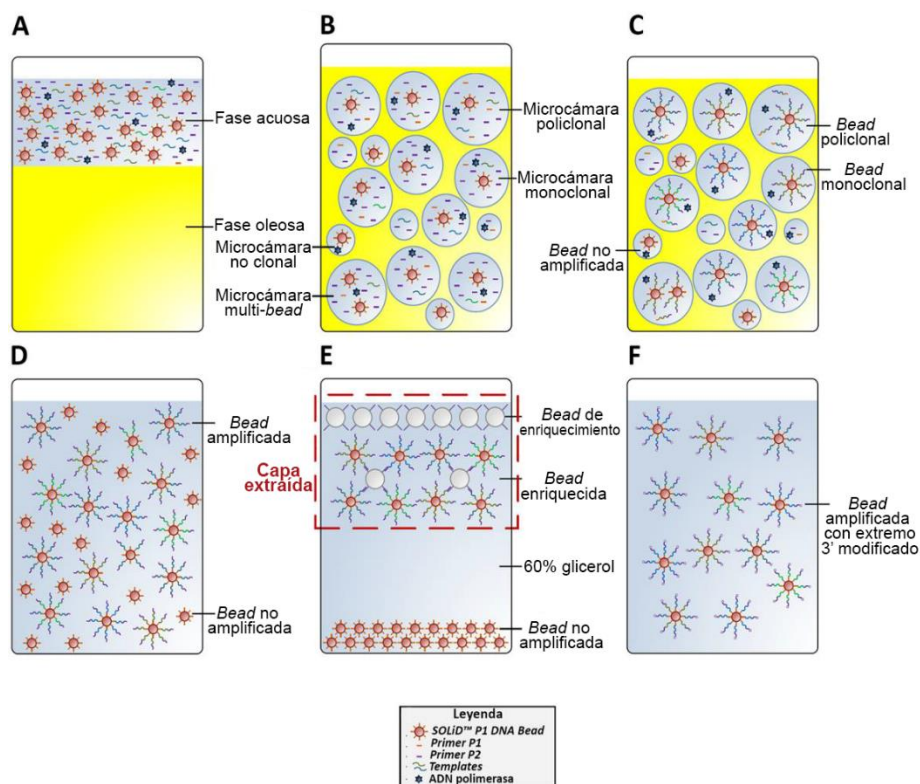


Figura 4. Amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADNc mediante PCR de emulsión. A, fase acuosa y fase oleosa previa a la emulsión. B, formación de las emulsiones o microcámaras de reacción. C, amplificación clonal de los fragmentos de ADNc aislados (*templates*). D, *beads* o microesferas amplificadas y no amplificadas tras la rotura de las emulsiones y los lavados. E, enriquecimiento de las *beads* amplificadas. F, modificación del extremo 3' de las *beads* amplificadas. ADNc, ADN complementario. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Los fragmentos de ADNc aislados en las distintas emulsiones se unen a las microesferas o “*SOLiD™ P1 DNA Beads*” a través de los adaptadores P1 que éstas contienen, y sirven de molde para su amplificación clonal gracias a la acción de la ADN polimerasa. Se generan así miles de copias (> 30.000) de estos fragmentos que posteriormente serán secuenciadas.

Para la *ePCR* se utilizó el kit *SOLiD™ ePCR (Life Technologies)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la formación de las emulsiones o microcámaras de reacción se prepararon en primer lugar las distintas fases por separado (Figura 4A):

- Fase oleosa: se mezclaron 1,8 ml de estabilizador 1, 400 µl de estabilizador 2 y 37,8 ml de aceite de emulsión. La mezcla se agitó y se dejó desgasificar durante al menos 20 minutos.
- Fase acuosa (para una concentración de la librería de 1,0 pM): se mezclaron 280 µl de tampón de *PCR* 10x, 392 µl del *mix* de dNTPs, 70 µl de cloruro de magnesio 1 M, 11,2 µl del *primer P1*, 16,8 µl del *primer P2*, 5,6 µl del ADNc previamente amplificado y purificado (*template*) a una concentración 500 pM, 1644,4 µl de agua libre de nucleasas y 300 µl de la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold®* 5 U/µl.
- *SOLiD™ P1 DNA Beads*: se agitó un tubo de estas *beads* enérgicamente y, tras dejarlo reposar, se eliminó el sobrenadante y las *beads* se resuspendieron en 200 µl de solución de bloqueo. A continuación se sonicaron con el equipo *Covaris™ S2 System*, se agitaron, se dejaron reposar para

eliminar el sobrenadante, y se volvieron a resuspender en tampón TEX 1x.

Para crear la emulsión se utilizó un *ULTRA-TURRAX® Tube Drive* (IKA®) (Figura 4B), y se repartió en volúmenes de 150 µl por pocillo en una placa de *PCR* de 96 que fue sellada con una película adhesiva transparente para evitar contaminaciones entre los pocillos. La reacción de *ePCR* se llevó a cabo en el sistema *GeneAmp® PCR 9700* con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Amplificación por *ePCR*.

| Etapa | | Temperatura | Tiempo |
|----------------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| Desnaturalización inicial | | 95°C | 5 minutos |
| 40 ciclos | Desnaturalización | 93°C | 15 segundos |
| | Hibridación | 62°C | 30 segundos |
| | Extensión | 72°C | 75 segundos |
| Extensión final | | 72°C | 7 minutos |
| – | | 4°C | – |

2.4.2 Rotura de la emulsión y lavado de las *beads*

Cuando la amplificación termina (Figura 4C), las emulsiones se rompen con 2-butanol y las *beads* amplificadas y no amplificadas se lavan para eliminar los restos de 2-butanol y de las fases junto con los reactivos de *PCR* (Figura 4D). Para ello, las emulsiones se recogieron en una bandeja *SOLiD™ Emulsion Collection Tray*, se añadieron 12 ml de 2-butanol, y se pipeteó hasta su completa homogeneización. A

continuación, se transfirió todo el contenido a un nuevo tubo de 50 ml que se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. La fase 2-butanol-aceite se decantó y el tubo se dejó boca abajo 5 minutos sobre papel absorbente.

Para lavar las *beads* se añadieron 600 μ l de tampón de lavado y, tras 2 minutos, se resuspendieron con una pipeta y se transfirieron a un tubo *LoBind* de 1,5 ml. A continuación, se agitó el tubo y se centrifugó a 21.000 g durante 1 minuto para eliminar la fase superior de aceite y el sobrenadante. Se realizó otro lavado con 300 μ l de tampón de lavado y por último las *beads* se resuspendieron en 200 μ l de tampón TEX 1x. Finalmente, las *beads* se sonicaron con el equipo *Covaris™ S2 System* y se estimó su concentración con el *SOLiD™ Bead Concentration Chart* y el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*). El rango de concentración óptimo para continuar el procedimiento está establecido entre 750.000 *beads*/ μ L y 1,25 millones de *beads*/ μ L. Para ajustar el volumen nos ayudamos de la escala de color que se muestra en la Figura 5.

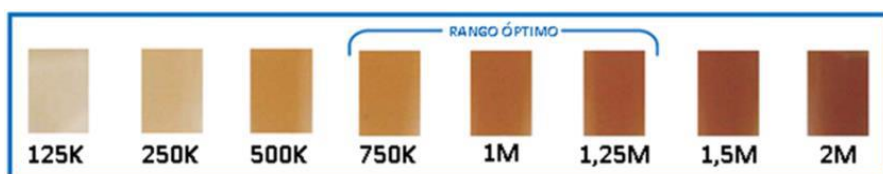


Figura 5. Escala de color de *SOLiD™ Bead Concentration Chart*. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

2.4.3 Enriquecimiento de las *beads* amplificadas

Este paso permite eliminar *beads* no amplificadas o mal amplificadas que han quedado tras la *ePCR* y los lavados. Para el enriquecimiento (Figura 4E), se usan *beads* de poliestireno con un adaptador P2 de cadena simple (*beads* de enriquecimiento) que capturan *beads* amplificadas tanto monoclonales como policlonales (150-300 millones). Para realizar este procedimiento, se centrifugaron 300 μ l de *beads* de enriquecimiento a 21.000 g durante 2 minutos para eliminar el sobrenadante y se lavaron dos veces con 900 μ l de tampón de unión y lavado. Seguidamente, se resuspendieron con 350 μ l de tampón de unión y lavado, se añadieron 3,5 μ l de oligo de enriquecimiento 1 mM, y se mantuvo el tubo en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente para facilitar la unión. A continuación, se lavaron con 900 μ l de tampón TEX 1x dos veces y se resuspendieron en 150 μ l de tampón de unión 1x bajo en sal.

Por otro lado, las *beads* resultantes de la *ePCR* se lavaron tres veces con 300 μ l de tampón desnaturalizante y tres veces más con 300 μ l de tampón TEX 1x. A continuación, se resuspendieron en 150 μ l de tampón TEX 1x, se transfirieron a un tubo *LoBind* y se sonicaron con el equipo *CovarisTM S2 System*.

Las *beads* de enriquecimiento se transfirieron al tubo *LoBind* con las *beads* resultantes de la *ePCR* previamente preparadas y se volvieron a sonicar. La mezcla de *beads* se incubó a 61°C durante 15 minutos e inmediatamente después se dejaron en hielo durante 2 minutos. Se añadió a la mezcla 600 μ l de glicerol 60% recién preparado y se

centrifugó a 21.000 g durante 3 minutos. Como resultado se forma una capa superior de *beads* de enriquecimiento (con y sin *beads* amplificadas unidas) y una capa inferior de *beads* no amplificadas (Figura 4E). La capa superior se recogió y se transfirió a un tubo *LoBind* que contenía 1 ml de tampón TEX 1x. Este tubo se agitó y se centrifugó a 21.000 g durante un minuto. Se eliminó el sobrenadante y las *beads* se resuspendieron en 400 µl de tampón TEX 1x.

Para separar las *beads* de enriquecimiento de las *beads* amplificadas se centrifugó el tubo de nuevo a 21.000 g durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Después, el conjunto de *beads* se lavó dos veces con 400 µl de tampón desnaturizante y dos veces más con 400 µl de tampón TEX 1x. Se resuspendieron con 200 µl de tampón TEX 1x y se sonicaron. Por último, las *beads* se lavaron con 400 µl de tampón TEX 1x y se resuspendieron en 400 µl de este mismo tampón. Tras este procedimiento las *beads* de enriquecimiento son lavadas, quedando las *beads* amplificadas con las que continuamos el protocolo.

2.4.4 Modificación de los extremos 3'

Con el fin de facilitar la unión covalente de las *beads* amplificadas a los portas de vidrio, se añade dUTP al extremo 3' de éstas usando una reacción de transferasa terminal (Figura 4F). Para ello, se preparó el tampón de reacción de la transferasa terminal (500 µl por reacción de *ePCR*) con 55 µl de tampón de transferasa terminal 10x, 55 µl de cloruro de cobalto 10x y 390 µl de agua libre de nucleasas. Las *beads* se lavaron dos veces con este tampón y se resuspendieron en 178 µl del mismo. Se añadieron 20 µl de solución de enlazado 1 mM y se

sonicaron con el equipo *CovarisTM S2 System*. A continuación, se añadieron 2 μ l de transferasa terminal (20 U/ μ l) al tubo que se mantuvo en rotación a 37°C durante 2 horas. Después, las *beads* se lavaron dos veces más con 400 μ l de tampón TEX 1x y se sonicaron de nuevo. Por último, se cuantificaron con el *SOLiDTM Bead Concentration Chart* y el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)*.

2.5 Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en la plataforma *SOLiD 5500XL*, utilizando el protocolo *50625 paired-end* y generando secuencias de 75 nucleótidos en dirección directa y 35 nucleótidos en dirección reversa, más 5 nucleótidos del *barcode*.

La tecnología *SOLiDTM* de *Applied Biosystems* utiliza un método enzimático conocido como secuenciación por ligación que emplea una ADN ligasa en vez de una polimerasa para identificar la secuencia nucleotídica. Este sistema utiliza sondas de dinucleótidos marcadas con cuatro fluoróforos distintos. Cada uno de ellos, a su vez, comprende cuatro combinaciones de dinucleótidos diferentes, dando lugar a un total de dieciséis combinaciones posibles (Figura 6). Las moléculas a secuenciar son hebras de simple cadena de ADN desconocido flanqueado por, al menos, un extremo de secuencia conocida. Cuando la sonda es complementaria a este ADN, la ADN ligasa cataliza la unión de los extremos 3'-hidroxilo y 5'-difosfato de la misma cadena, liberándose el grupo fosfato con el marcador fluorescente correspondiente que es detectado por el secuenciador. La señal, por

tanto, corresponderá a la secuencia complementaria al ADN desconocido en esa posición concreta.

La ADN ligasa tiene muy baja eficiencia cuando no hay complementariedad entre las bases de dos cadenas de ADN, lo que hace que la unión de las sondas dinucleotídicas sea mucho más específica. En la secuenciación por ligación cada posición es evaluada dos veces, lo que aumenta drásticamente la discriminación entre errores de secuencia y polimorfismos de SNPs.

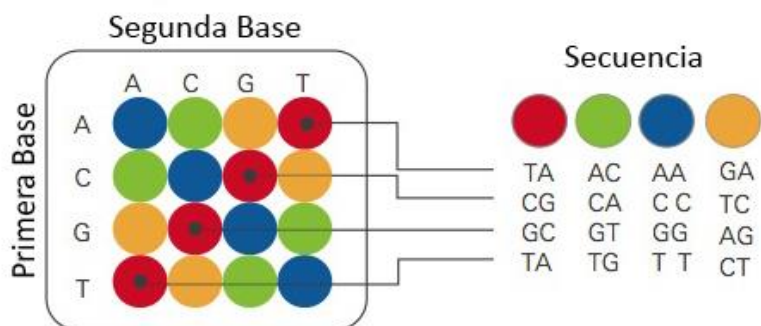


Figura 6. Método de codificación de la tecnología SOLiD™. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Después de la modificación de los extremos 3', las *beads* amplificadas se depositaron en portas de vidrio en disposición aleatoria (Figura 7). Cada porta puede segmentarse en una, cuatro u ocho secciones, permitiendo la secuenciación de hasta 256 muestras en un mismo proceso de secuenciación o *run*.

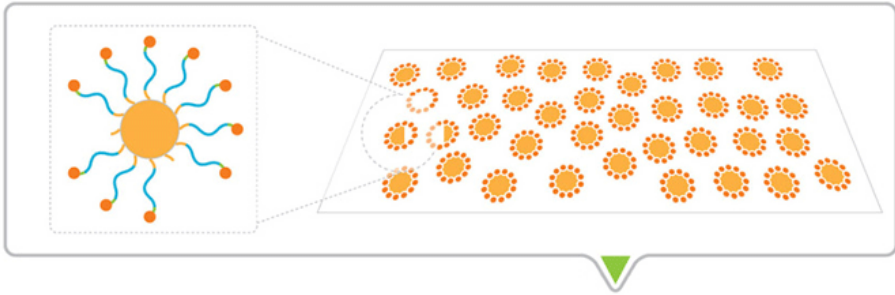


Figura 7. Depósito de beads en portas de vidrio. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Una vez cargados los portas en la plataforma, los cebadores hibridan con el adaptador-P1 de las beads (Figura 8).

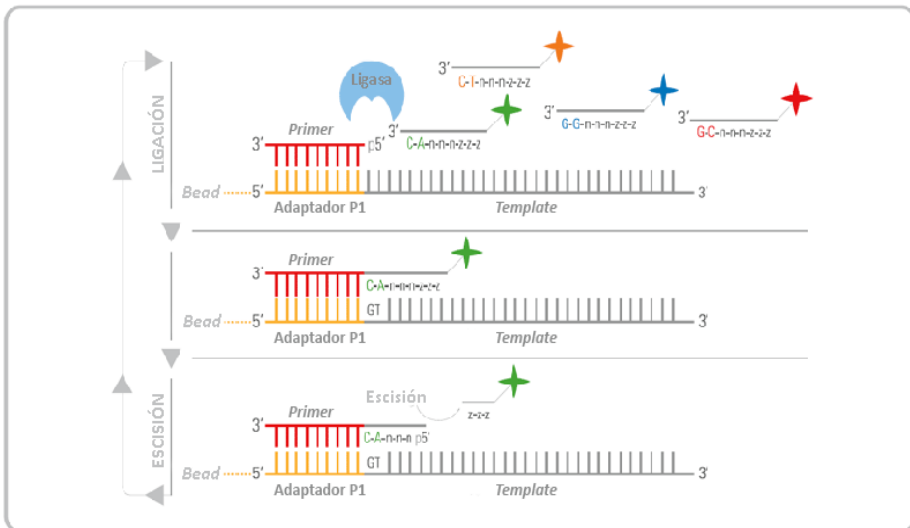


Figura 8. Secuenciación por ligación. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

El conjunto de sondas dinucleotídicas marcadas con los distintos fluoróforos compiten por la ligación al cebador (Figura 8). La especificidad de la unión se logra interrogando cada una de las bases de

2.6 Análisis computacional de los resultados

Las lecturas iniciales de todo el transcriptoma obtenidas por secuenciación fueron mapeadas contra la última versión disponible del genoma humano (versión GRCh37/hg19) utilizando el algoritmo de mapeo diseñado por *Life Technologies* (<http://www.lifetechnologies.com/>; versión 1.3). Se utilizaron los parámetros estándar del software *BioScope*TM, versión 1.3, en el análisis de extremos pareados y de todo el transcriptoma. Para ambas lecturas, directa y reversa, se establecieron los 25 primeros nucleótidos con un máximo de 2 errores permitidos. Los archivos alineados se presentaron en formato BAM/SAM¹⁷⁴. Las lecturas de mala calidad (Phred score <10) se eliminaron usando el software *Picard Tools* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>; version 1.83).

Posteriormente, la predicción de genes se estimó utilizando el método de *Cufflinks*¹⁷⁵ y los niveles de expresión se calcularon usando el software *HTSeq*, versión 0.5.4p3¹⁷⁶. Sólo las lecturas únicas fueron consideradas para la estimación de los niveles de expresión génica. El método *edgeR* (versión 3.2.4), se utilizó para el análisis de expresión diferencial entre la condición patológica y normal¹⁷⁷. Este software permite la normalización de los datos obtenidos basándose en la profundidad de cobertura de la secuenciación, y la composición en CGs y longitud de los genes. En el proceso de la expresión diferencial, se usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de *RNA-seq* y tener en cuenta tanto la variabilidad biológica como técnica.

Además, se emplean métodos de *Bayes* empíricos para moderar el grado de dispersión de los transcritos, mejorando la fiabilidad de la inferencia. Los datos de secuenciación obtenidos se depositaron en la base de datos del NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GEO#GSE42955 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?ac=GSE55296>)¹⁷⁸.

3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN DE ARN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

3.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó con el kit de extracción *RNeasy® Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Trabajando a 4°C, se pesaron fracciones de aproximadamente 30 mg de las muestras de VI previamente almacenadas a -80°C, y se pasaron a tubos *Lysing Matrix D (MP Biomedicals)* que contenían 300 µl de tampón RLT (con isotiocianato de guanidina para facilitar la lisis del tejido) y 3 µl de β-mercaptoetanol (para desnaturalizar ribonucleasas). Para la homogeneización se utilizó el programa MP 24x2 del sistema *FastPrep-24 (MP Biomedicals)*, realizándose un total de 8 ciclos de 30 segundos a 6,5 m/s. A continuación, los tubos *Lysing Matrix D* se centrifugaron 1 minuto a 16.000 g (*centrífuga Eppendorf modelo 5415 R*) para bajar la espuma, y se añadió a cada uno 590 µl de agua libre de RNasas (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen*) y 10 µl de proteinasa K para realizar la digestión de proteínas de la muestra a 55°C durante 10 minutos.

Tras centrifugar 3 minutos a 16.000 g se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió al volumen recuperado etanol 96% en relación 1:2, y se mezcló por inversión. Seguidamente, se pasó todo el volumen por tubos *mini column* que contienen una membrana de sílice a la que se une específicamente el ARN. Las columnas se lavaron con 350 µl de tampón de lavado RW1 y los restos de ADN se eliminaron con un

tratamiento con DNasa disuelta en tampón RDD. Las columnas se volvieron a lavar con 350 μ l de tampón RW1 y dos veces más con tampón RPE para eliminar restos de DNasa y cualquier contaminante que pudiera haber quedado. Finalmente, el ARN se eluyó con 35 μ l de agua libre de RNasas, se evaluó su concentración mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*), y su pureza e integridad mediante una plataforma *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*). Todas las muestras de ARN alcanzaron un RIN $\geq 7,0$, y se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.2 Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total

El ARN total se sometió a un segundo tratamiento con DNasas para eliminar cualquier resto de ADN persistente. Para ello se incubó 1 μ g de ARN total de cada una de las muestras con DNasa I (*Deoxyribonuclease I from bovine pancreas*, *Sigma-Aldrich*) a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (*Phenol:Chloroform 5:1*, *Sigma-Aldrich*) y una con cloroformo isoamílico (*Chloroform - isoamyl alcohol mixture*, *FLUKA*, *Sigma-Aldrich*). A continuación, se precipitó el ARN con etanol 100% y glucógeno (*Glycogen from Mytilus edulis*, *Sigma-Aldrich*) y se almacenó a -20°C durante toda la noche.

Para la resuspensión se centrifugaron las muestras a 16.000 g durante 45 minutos a 4°C , se lavó cada *pellet* con etanol 70% y se dejó secar 30 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 10 μ l de agua libre de RNasas en hielo durante al menos 1 hora y se conservó a -80°C hasta su uso.

3.3 Retrotranscripción a ADNc

En la retrotranscripción o transcripción reversa (*RT*), el ARN es retrotranscrito a ADNc mediante la acción de la transcriptasa reversa que utiliza o bien una mezcla de oligómeros contruidos al azar (*random primers*) retrotranscribiendo indiscriminadamente una mezcla de ARNs, u oligos(dT) amplificando exclusivamente aquellos ARNm que lleven cola poli(A), o bien cebadores específicos de secuencia diseñados para la posterior amplificación de un determinado ARNm (Figura 10). El ADNc que se obtiene como resultado del proceso de *RT* (Figura 11) será utilizado como molde en la reacción de *RT-qPCR* en una etapa posterior y será amplificado por la Taq polimerasa, una ADN polimerasa termostable, cualidad que la hace idónea para técnicas de *PCR*¹⁷⁹.

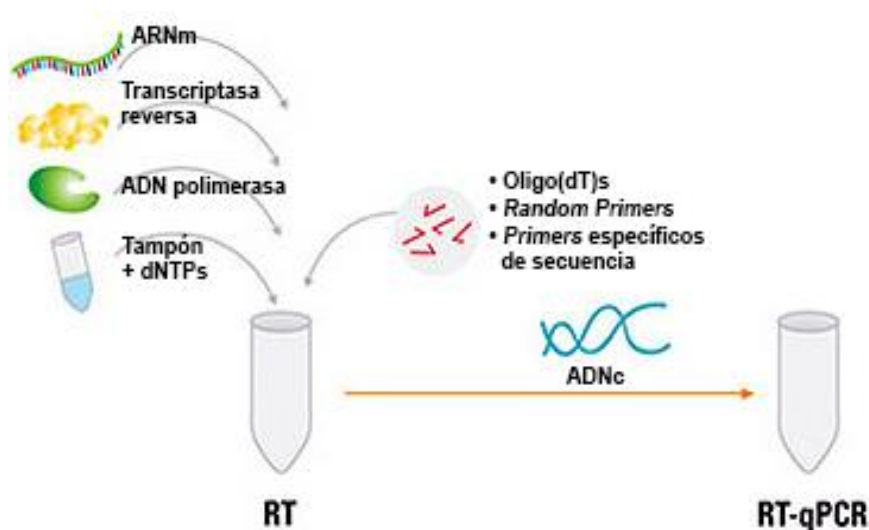


Figura 10. Componentes de la retrotranscripción. ADNc, ADN complementario; *RT*, transcripción reversa; *RT-qPCR*, *PCR* cuantitativa en tiempo real. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

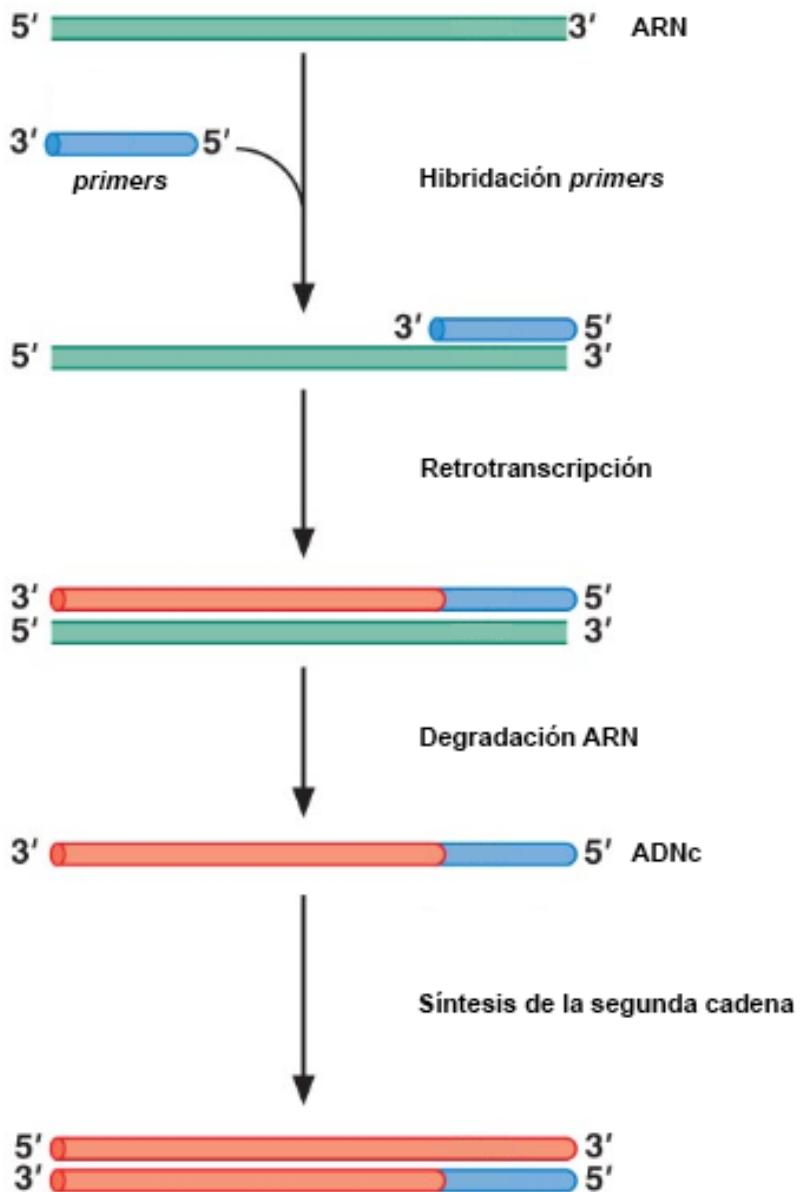


Figura 11. Esquema de la retrotranscripción. ADNc, ADN complementario. (Modificada de <http://andrew.gibiansky.com>).

Para la retrotranscripción del ARN se preparó en frío, para un volumen final de 20 μ l, un *mix* por cada muestra compuesto por:

- 10 μ l de ARN
- 1 μ l de *random primers* (Invitrogen)
- 1 μ l de *dNTPs Mix* 10 mM (Invitrogen)

Los tubos se incubaron a 65°C durante 5 minutos, tras lo que se añadió a cada uno:

- 4 μ l de tampón *FS* 5x (Invitrogen)
- 2 μ l de *DTT* 0,1 M (Invitrogen)
- 1 μ l de *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen)

A continuación, se incubaron los tubos a 37°C durante 2 minutos e inmediatamente después se añadió, a todos menos a los controles negativos, 1 μ l de la transcriptasa reversa (*M-MLV Reverse Transcriptase*, *Invitrogen*). Los controles negativos nos servirán para detectar posibles contaminaciones por ADN, y a estos tubos añadiremos en su lugar 1 μ l de agua libre de RNasas para que todos tengan el mismo volumen. Tras añadir la transcriptasa reversa, se realizó una primera incubación a 25°C durante 10 minutos y otra segunda incubación a 37°C durante 90 minutos. Trascurrido este tiempo el ADNc obtenido se almacenó a -20°C inmediatamente. Paralelamente se realizó el mismo protocolo con las muestras de ARN pero sin la transcriptasa reversa, con 1 μ l de agua libre de RNasas. De esta forma obtuvimos controles negativos que nos revelaron la no contaminación por ADN.

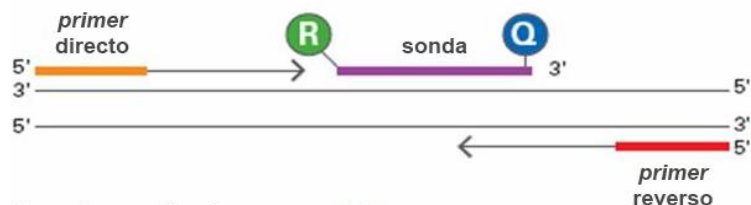
3.4 Reacción de RT-qPCR

La *PCR* cuantitativa en tiempo real, o *RT-qPCR*, es un método de cuantificación relativa de ácidos nucleicos basado en la monitorización de la progresión de la amplificación usando técnicas de fluorescencia, de manera que la emisión fluorescente es proporcional a la cantidad de producto amplificado. La curva de amplificación está constituida por al menos tres fases distintas: una fase de latencia en la que el producto no es detectable, una fase exponencial en la que se produce la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes, y una fase de *plateau* o saturación^{179, 180}.

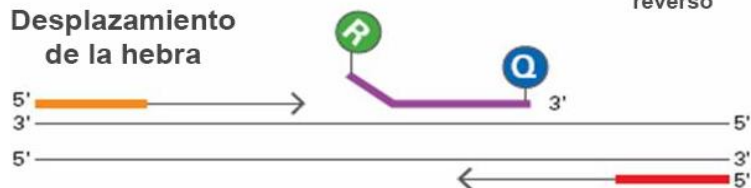
La cuantificación se produce usando un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. Los marcadores fluorescentes utilizados habitualmente en este tipo de técnicas son el *SYBR-Green* y las sondas *Taqman*. *SYBR-Green* es un agente intercalante fluorescente que se une al surco mayor del ADN, de esta manera la fluorescencia aumenta con la cantidad de producto formado. Con este método, a diferencia de la sonda *Taqman*, la señal fluorescente aumenta tanto con el número de moléculas como con su longitud, además de cuantificarse productos inespecíficos, lo que introduce errores en los resultados. Sin embargo, las sondas *Taqman* son sondas de hidrólisis específicas de secuencia, bloqueadas en su extremo 3' por ddNTPs para que no puedan ser extendidas, y portadoras de dos fluorocromos: un *reporter* unido a su extremo 5', y un *quencher* unido al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda está intacta, ambos fluorocromos presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (*FRET*).

La sonda hibrida específicamente con el amplicón mientras la Taq-polimerasa comienza a copiar a partir del extremo 3' del ADNc. Cuando la polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza gracias a su actividad exonucleasa 5'–3', provocando que el *reporter* se separe del *quencher* de forma que este último ya no puede “secuestrar” la fluorescencia del *reporter* que, tras la hidrólisis, ha quedado en solución^{179, 180} (Figura 12).

Polimerización



Desplazamiento de la hebra



Hidrólisis



Polimerización completa

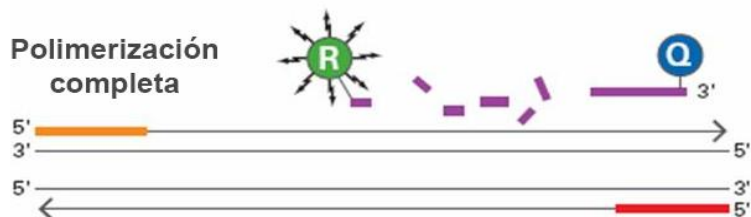


Figura 12. Esquema de la RT-qPCR con sondas *Taqman*. R, *reporter*; Q, *quencher*. (Modificada de www.the-scientist.com).

Para cuantificar la expresión génica relativa del gen en estudio, se comparan los niveles de expresión del gen problema con los de uno o más genes constitutivos cuya expresión no varía entre los distintos tratamientos o condiciones del experimento. Estos genes constitutivos son controles endógenos y son conocidos como genes de referencia o *housekeeping*. Los niveles de expresión se determinan a través de los valores de *Ct* o ciclo umbral. *Ct* se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto al umbral establecido o *threshold*. Es decir, el corte entre el *threshold* y la curva de amplificación determina el *Ct* empleado en la cuantificación (Figura 13). Este parámetro se calcula siempre en la fase exponencial de la curva y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde^{179, 180}.

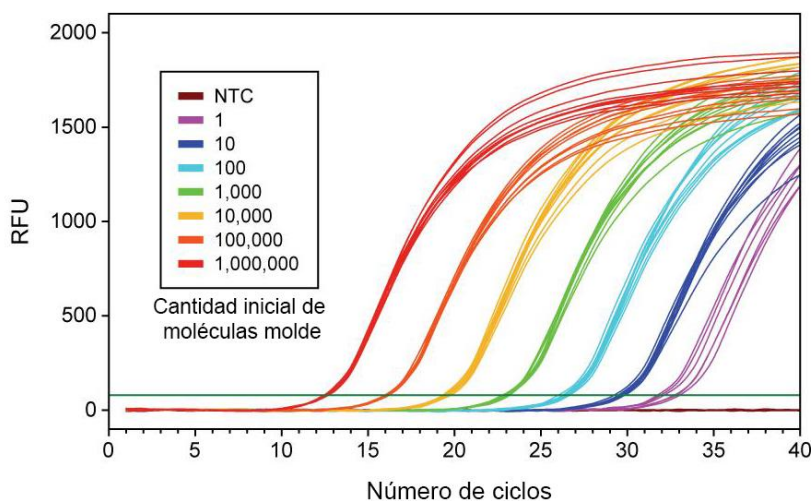


Figura 13. Ejemplo de amplificación por RT-qPCR. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. Conforme la concentración inicial de moléculas molde aumenta, los ciclos disminuyen. NTC, *no template control* (control negativo); RFU, unidades de fluorescencia relativa. (Modificada de www.5prime.com).

Para la correcta cuantificación de la expresión génica debemos averiguar cuál es la concentración óptima de partida del ADNc para la amplificación por *RT-qPCR*. Para ello, realizamos una primera prueba de diluciones donde se ensayaron las distintas sondas de estudio y de referencia (Tabla 3) con el ADNc sin diluir y diluido a las concentraciones 1/5, 1/10 y 1/20, de dos muestras representativas del total de incluidas en el estudio. Las sondas de referencia o *housekeeping* seleccionadas han de mantener una expresión constante en las muestras estudiadas; en nuestro caso seleccionamos las sondas *GAPDH*, *PGK1* y *TFRC*.

Tabla 3. Sondas utilizadas en la validación por *RT-qPCR*.

| GEN | SONDA |
|----------------|---------------|
| <i>COL4A5</i> | Hs00166712_m1 |
| <i>COL8A1</i> | Hs00156669_m1 |
| <i>COL14A1</i> | Hs00964045_m1 |
| <i>COL16A1</i> | Hs00156876_m1 |
| <i>GAPDH</i> | Hs99999905_m1 |
| <i>PGK1</i> | Hs99999906_m1 |
| <i>TFRC</i> | Hs00951083_m1 |

Para la *RT-qPCR*, trabajando a 4°C, se preparó para un volumen final de 20 µl un *mix* por cada muestra compuesto por:

- 3 µl de ADNc
- 10 µl de *TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®)*
- 1 µl de de la sonda *TaqMan®* correspondiente (*Thermo Fisher Scientific*)
- 6 µl de agua libre de RNasas

Una vez preparados, cargamos la placa (*96-well reaction plate, Applied Biosystems*) y la centrifugamos a 82 g durante 1 minuto. Utilizamos el termociclador *ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Una vez realizada la prueba de diluciones, elegimos aquella dilución que amplificaba dentro del rango de *Cts* adecuado con todas las sondas y muestras representativas ensayadas. Se realizaron las placas correspondientes para cada gen en estudio con el objetivo de validar la expresión génica diferencial encontrada entre las muestras de pacientes y las muestras CNT en el análisis de secuenciación de ARN previamente realizado.

3.5 Cuantificación relativa de la expresión génica

Para realizar el cálculo de la expresión génica relativa empleamos el método matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ¹⁸¹. Este método calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre un gen de estudio y uno o más genes de referencia. Además, no requiere de la elaboración de una

curva estándar, lo que lo hace muy útil para el análisis de una gran cantidad de muestras. Para que los cálculos sean válidos, las eficiencias de amplificación del gen de estudio y de referencia deben ser aproximadamente iguales, lo que requiere de fragmentos de amplificación inferiores a 150 pares de bases (pb) para que la eficiencia sea óptima (aproximadamente 1).

La ecuación que describe la amplificación exponencial de la *PCR* es:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n \quad (1)$$

Donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de copias del gen X ; E_x es la eficiencia de la amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la *PCR*.

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_X \quad (2)$$

El C_T es el ciclo en el cual la fluorescencia del gen alcanza el umbral fijado. X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_T ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_T del gen X y K_X es una constante.

De manera similar, la ecuación para el gen de referencia es:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (3)$$

Donde R_T es el número de copias del gen de referencia; R_0 es el número inicial de copias del gen de referencia; E_R es la eficiencia de amplificación del gen de referencia; $C_{T,R}$ es el ciclo C_T del gen de referencia y K_R es una constante del gen de referencia.

Dividiendo la ecuación 2 y 3, y asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen X, tenemos:

$$\frac{X_0}{R_0} x (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (4)$$

$$X_N x (1 + E)^{\Delta C_T} = K \quad (5)$$

Donde X_N es a cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia de los C_{Ts} del gen de estudio y del gen de referencia.

Ordenando la ecuación y dividiendo el X_N de cualquier muestra q, entre el X_N de la muestra calibrador (cb) obtenemos:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K x (1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K x (1+E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (6)$$

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}) \quad (7)$$

Para fragmentos de un tamaño menor de 150 pb, en el cual las concentraciones de cebadores y Mg^{2+} han sido adecuadamente optimizadas, la eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces, la cantidad del gen de estudio, normalizada a una referencia, y relativa a una muestra calibrador es:

$$cantidad\ de\ gen\ diana = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (8)$$

4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS

4.1 Homogeneización y extracción proteica total

La extracción proteica total se realizó a partir de fracciones de aproximadamente 30 mg de las muestras de VI, previamente almacenadas a -80°C , que se pasaron a tubos *Lysing Matrix D* (MP Biomedicals) que contenían 300 μl de un tampón de extracción de proteínas (2% SDS, 10 mM EDTA, 6 mM Tris-HCl, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ apronitina y 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ leupeptina). La homogeneización del tejido se llevó a cabo utilizando el programa MP 24x2 del sistema *FastPrep-24* (MP Biomedicals) realizándose un total de 6 ciclos de 60 segundos a 6,5 m/s. A continuación, los tubos *Lysing Matrix D* se centrifugaron a 10.000 g a 4°C durante 5 minutos (*centrífuga Eppendorf modelo 5415 R*), y se recogió el sobrenadante en tubos estériles de 1,5 ml que se volvieron a centrifugar a 16.000 g a 4°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes se alicuotaron para la posterior determinación de la concentración proteica. Todo el proceso de extracción se realizó a 4°C .

4.2 Determinación de la concentración proteica

La determinación de la cantidad de proteínas de las muestras se realizó utilizando el método espectrofotométrico de *Lowry* (1951) con la modificación de *Peterson* (1977), utilizando el kit *Total Protein Kit, Micro Lowry* (*Sigma Diagnostics*) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El método de *Lowry* está basado en la proporcionalidad entre

la intensidad de color de la disolución y la concentración de proteínas según la Ley de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar dependiente de la longitud de onda ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l es la longitud del camino óptico (cm), y c es la concentración de la sustancia (M).

La reacción colorimétrica tiene lugar en dos etapas (Figura 14):

- 1) Los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con los iones Cu^{2+} formando complejos de coordinación $\text{Cu}^{2+}\text{-N}$ de color azul pálido. Esta reacción se produce en medio alcalino y en presencia de tartrato para evitar la precipitación. La formación de los complejos de coordinación provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción.
- 2) El ácido fosfomolibdotúngstico (de color amarillo), principal componente del reactivo *Folin & Ciocalteau*, reacciona con los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, y se reduce produciendo un color azul intenso.

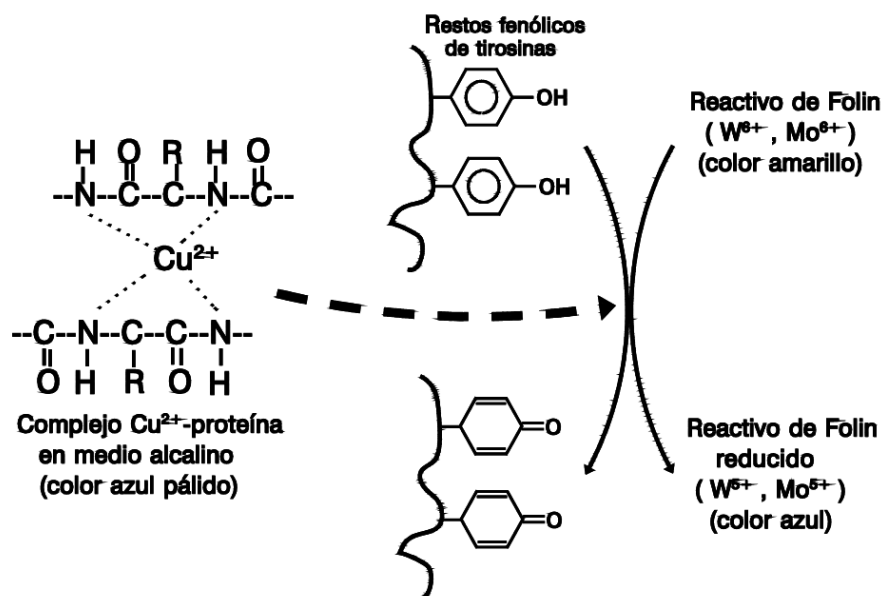


Figura 14. Reacción colorimétrica del método de Lowry. (Extraída de <http://yunelijo-k.blogspot.com.es>).

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm, utilizando como referencia la longitud de onda de 450 nm. La concentración proteica se calculó por interpolación de la absorbancia en una curva de calibración, usando distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar¹⁸².

Tras la determinación de los niveles de proteínas, se hicieron alícuotas de 60 μ l de cada homogeneizado en tubos estériles de 0,5 ml que se guardaron a $-80^{\circ}C$ hasta su utilización.

4.3 Western Blot

4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras se descongelaron a 4°C y se prepararon según las condiciones de electroforesis (Tabla 4). Se utilizaron geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12%* de poliacrilamida de 20 y 26 pocillos, así como geles *NuPAGE® Novex Tris-Acetato 3-8%* de 20 pocillos para la separación electroforética de proteínas con un mayor peso molecular. El volumen final de carga fue de 15 µl y 25 µl para los geles de 26 y 20 pocillos, respectivamente. Se utilizaron condiciones de electroforesis tanto reductoras (R) como no reductoras (NR) en función de las proteínas de estudio.

Tabla 4. Preparación de las muestras en función de las condiciones de electroforesis empleadas.

| | <i>NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel, 4–12% polyacrylamide</i> | | <i>NuPAGE® Novex Tris-Acetate Gel, 3-8% polyacrylamide</i> |
|--|---|-------------|--|
| | 20 pocillos | 26 pocillos | 20 pocillos |
| Volumen (µl) | R | R | NR |
| Muestra | * | * | * |
| <i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)</i> | 6,25 | 3,75 | 6,25 |
| <i>NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)</i> | 2,5 | 1,5 | – |
| Agua bidestilada | ** | *** | ** |

R, reductoras; NR, no reductoras.*Volumen de muestra necesario para tener una concentración de proteína de 45 µg/µl. Volumen de agua bidestilada necesario para completar el volumen final de **25 µl y ***15 µl.

La electroforesis SDS-PAGE separa las proteínas en función de su carga y tamaño gracias al detergente aniónico SDS, que desnaturaliza las proteínas y aporta una carga negativa proporcional a la masa de éstas. En condiciones reductoras, además de producirse la desnaturalización proteica, se reducen los puentes disulfuro gracias a la acción de reactivos como el ditioneitról (DTT) o el β -mercaptoetanol.

▪ 4.3.1.1. *Electroforesis en condiciones no reductoras*

Una vez preparadas las muestras, se desnaturalizaron las proteínas a 70°C durante 10 minutos usando un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*). Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) que contenía tampón de electroforesis MES 1x (20x *NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*), y se cargó el volumen correspondiente de las muestras en sus respectivos pocillos, junto con un marcador de peso molecular conocido (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen*).

▪ 4.3.1.2. *Electroforesis en condiciones reductoras*

Después de la preparación de las muestras con el agente reductor (*NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen*), se desnaturalizaron las proteínas a 70°C durante 10 minutos usando un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*). Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) que contenía tampón de electroforesis MES 1x (20x *NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*), y agente antioxidante (1/400,

NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen) en la zona de la cubeta en contacto con los geles (cámaras internas). A continuación, se cargó el volumen correspondiente de las muestras en sus respectivos pocillos, junto con un marcador de peso molecular conocido (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen*).

Para la separación de proteínas y posterior detección de COL4A5, COL14A1 y COL16A1, se utilizaron geles *NuPAGE® Novex Tris-Acetato 3-8%* en condiciones no reductoras. Para la detección de COL8A1, TGF- β 1, y MMP2, los geles utilizados fueron geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12%* bajo condiciones reductoras.

Las condiciones de voltaje y amperaje utilizadas en el caso de geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris* fueron de 200 V y 200 mA durante 90 minutos. Para los geles *NuPAGE® Novex Tris-Acetato*, las condiciones de voltaje y amperaje fueron de 150 V y 90mA durante 120 minutos. De este modo se separaron proteínas de pesos moleculares de entre 3,5 y 260 kDa, en geles verticales (13 x 8,3 cm) de poliacrilamida en gradiente (4-12% y 3-8%, respectivamente) de 20 y 26 pocillos.

Tras la electroforesis, se procedió a la transferencia y tinción de los geles.

4.3.2 Transferencia en seco

Las proteínas previamente separadas en geles de poliacrilamida fueron transferidas a un soporte sólido para permitir la inmunodetección; concretamente a membranas de PVDF, utilizando el sistema en seco *iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)*. Este método se basa en la

transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana gracias a la creación de un campo eléctrico (electrotransferencia) mediante el montaje de un sándwich con los componentes necesarios tal y como se muestra en la Figura 15.

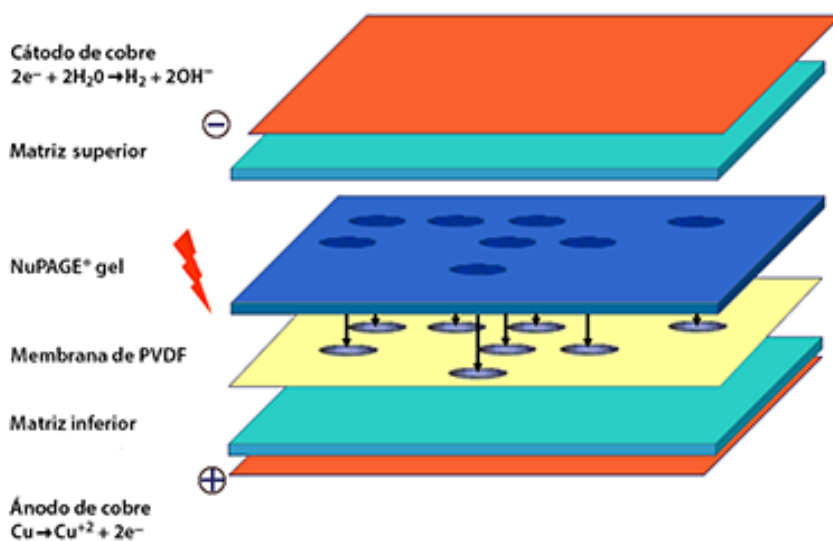


Figura 15. Esquema de la transferencia en seco mediante el sistema iBlot™ Dry Blotting System. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Los iBlot® Gel Transfer Stacks superior e inferior son matrices gelificadas que incorporan los tampones de cátodo y ánodo, respectivamente, actuando como depósitos de iones. Este formato elimina la necesidad de utilizar tampones elaborados previamente minimizando la manipulación. El diseño de la unidad iBlot® Gel Transfer Device reduce la distancia entre los electrodos y el voltaje necesario, lo que combinado con la tecnología de la matriz gelificada de los iBlot® Gel Transfer Stacks, permite generar una alta energía y

corriente aumentando así la velocidad de transferencia de las proteínas, reduciendo considerablemente el tiempo del proceso.

Para llevar a cabo esta técnica, se separó el cátodo del ánodo del *iBlot® 2 Transfer Stacks* a través del papel separador que se encuentra entre ambas partes. Se colocó la parte correspondiente al ánodo sobre la superficie del dispositivo *iBlot® 2 Gel Transfer Device*, quedando la capa de cobre en la parte inferior y la membrana de PVDF (0,2 μm) en la parte superior. Seguidamente, se colocó el gel resultante de la electroforesis sobre esta membrana y, sobre él, un papel de filtro humedecido (*iBlot® Filter Paper*) con el propio tampón de electroforesis. Para eliminar cualquier burbuja entre el gel y la membrana que pudiera interferir en la transferencia, se utilizó el rodillo *Blotting Roller*. A continuación, se colocó el cátodo sobre el papel de filtro quedando la superficie de cobre en la cara externa, y se volvieron a eliminar las posibles burbujas con el *Blotting Roller*. Por último, se colocó una esponja de melamina blanca (*iBlot® 2 Absorbent Pad*) que contiene una tira metálica en uno de los extremos para hacer contacto con la tapa del dispositivo, completando así el circuito eléctrico. Esta esponja, además, absorbe el exceso de líquido generado durante la transferencia y ejerce una presión uniforme sobre la superficie del sándwich durante la transferencia. Finalmente, se cerró la tapa y se eligió el programa de transferencia. Para geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris* se eligió un voltaje constante de 20 V durante 10 minutos, y para geles *NuPAGE® Novex Tris-Acetato* se eligió un voltaje constante de 10 V durante 25 minutos.

Terminada la transferencia, se tiñó el gel para comprobar la eficacia de la misma y la membrana de PVDF se incubó inmediatamente con tampón TBS con 0,05% de Tween (TBS-T) y 1% de BSA (*Tipo V, Sigma*), durante toda la noche a 4°C, para bloquear posibles sitios de unión inespecíficos.

4.3.3 Tinción de geles

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con el kit de tinción de *Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen)*. El gel se sumergió en la solución de tinción (20% *Stainer A*, 5% *Stainer B* y 20% metanol), y estuvo en agitación constante durante un mínimo de 3 horas y un máximo de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se mantuvo con agua bidestilada en agitación suave durante un mínimo de 7 horas y un máximo de 2 días para eliminar el exceso de tinción.

4.3.4 Inmunodetección

El protocolo utilizado para detectar las proteínas transferidas se basó en el descrito por Tobwin *et al.*¹⁸³ en 1979:

- Lavado de la membrana con TBS-T: se sustituyó la solución de bloqueo (BSA) en la que se habían incubado las membranas por TBS-T.
- Incubación con el anticuerpo primario: se sustituyó el TBS-T del lavado por TBS-T con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5), y se incubó la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave.

Tabla 5. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección.

| Proteína | Descripción | Dilución | Casa comercial | Referencia |
|----------------|----------------------|----------|-------------------|------------------|
| COL4A5 | Policlonal de conejo | 1/100 | <i>Santa Cruz</i> | <i>sc-11360</i> |
| COL8A1 | Policlonal de conejo | 1/1.000 | <i>Abcam</i> | <i>ab-100988</i> |
| COL14A1 | Policlonal de conejo | 1/1.000 | <i>Abcam</i> | <i>ab-101464</i> |
| COL16A1 | Policlonal de conejo | 1/800 | <i>Sigma</i> | <i>HPA027237</i> |
| MMP2 | Monoclonal de ratón | 1/800 | <i>Abcam</i> | <i>ab-80738</i> |
| TGFβ1 | Monoclonal de ratón | 1/2.000 | <i>Abcam</i> | <i>ab-27969</i> |
| GAPDH | Monoclonal de ratón | 1/800 | <i>Abcam</i> | <i>ab-9484</i> |

- Lavados: tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 2 lavados con TBS-T durante 10 minutos en agitación para eliminar restos de anticuerpo que no se hubiese unido a la membrana.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se utilizaron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*), a una dilución 1/10.000 en TBS-T con 1% de Nonidet-P40 (*Nonidet™ P 40 Substitute, Sigma-Aldrich*). La incubación se realizó en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Lavados: tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 2 lavados de 10 minutos con TBS-T y otros 2 lavados de 10 minutos con TBS, siempre en agitación.
- Revelado del antígeno-anticuerpo: se incubó la membrana con solución de revelado BCIP/NBT (*SigmaFast™BCIP®/NBT Tablet, Sigma-Aldrich*) preparada en el momento de uso y en oscuridad (1 pastilla en 10 ml de agua bidestilada). La reacción se llevó a cabo en total oscuridad durante un máximo de 1 hora. NBT (*nitroblue tetrazolium*) es un compuesto formado por la unión de dos grupos tetrazol con un alto poder oxidante. Se utiliza comúnmente en inmunología para la detección de la actividad fosfatasa alcalina, enzima usada como marcador conjugado a un anticuerpo. NBT se usa en combinación con BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato), un sustrato cromogénico artificial que es hidrolizado por la fosfatasa alcalina dando lugar a una forma intermedia que experimenta tautomerización (Figura 16) para posteriormente ser oxidada por el NBT, que pasa a su forma reducida (NBT-formazan); el NBT-formazan junto con la forma oxidada del BCIP (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo White) forman un precipitado insoluble de color violeta intenso cuantificable. Esta reacción conjunta BCIP/NBT es mucho más sensible y precisa que ambas reacciones por separado¹⁸⁴.

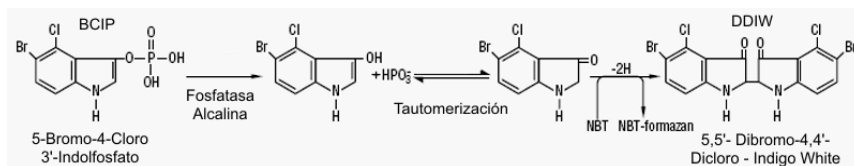


Figura 16. Reacción BCIP/NBT. (Extraída de <http://lookfordiagnosis.com>).

- Parada de la reacción colorimétrica: una vez se visualizaron las bandas se paró la reacción colorimétrica con agua bidestilada, realizándose 3 lavados de 10 minutos. Seguidamente, se dejó secar la membrana en papel de filtro durante al menos 24 horas.
- Análisis cuantitativo de las membranas: la membrana ya secada se digitalizó utilizando una estación de análisis de imagen para aplicaciones colorimétricas y de fluorescencia (*DNR Bio-Imaging Systems*), equipada con un software de cuantificación de geles y membranas (*GelQuant Pro v12.2*). Los valores obtenidos se relativizaron a GAPDH y finalmente al grupo CNT.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar para las variables continuas y como porcentaje para las discretas. La distribución de las variables se analizó utilizando el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Las características clínicas de los pacientes se compararon mediante el test *t-Student* para las variables continuas y el test exacto de *Fisher* para las variables discretas. La comparación entre grupos de los niveles de ARNm y proteína en tejido se realizó utilizando el test *t-Student* para las variables con una distribución normal y mediante el test no paramétrico *U de Mann-Whitney* para las variables con una distribución no normal. Para estudiar la relación simple entre los niveles de expresión de ARNm y proteína con los parámetros de función y remodelado ventricular se realizó un análisis de regresión simple utilizando el coeficiente de correlación (r) de *Pearson* para las variables normales y el coeficiente de correlación de *Spearman* para las variables con una distribución no normal. La significación estadística se estableció para valores de $P < 0,05$. Las unidades de *Fold Change* representan el grado de inducción sobre los niveles de expresión de los controles. Se consideró un *Fold Change* $\geq 1,3$ para establecer diferencias de expresión génica y proteica entre pacientes y controles. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS para Windows (versión 20; *IBM SPSS Inc*).

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación de este estudio es la inherente variabilidad de las muestras cardiacas, dado su origen humano y el tratamiento farmacológico al que los pacientes estaban sometidos. Todos los pacientes estaban recibiendo tratamiento convencional, y algunas de estas terapias podrían afectar a los niveles de ARNm y proteicos. Para seleccionar una población etiológicamente homogénea, elegimos pacientes con MCD sin antecedentes familiares de la enfermedad, y pacientes con etiología isquémica. Asimismo, queremos enfatizar la importancia de haber realizado este estudio en un número significativo de muestras patológicas y controles, haciendo que nuestros resultados sean aplicables a las poblaciones con MCD y MCI. Además, el hecho de trabajar con corazones explantados y nuestra presencia en quirófano en el momento del trasplante nos permite extraer la región de tejido que queremos analizar reduciendo el tiempo entre su obtención y conservación, preservando la calidad de las muestras y haciendo el estudio más homogéneo, lo cual no sería posible si se hiciera con muestras de tejido biopsiado.



RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA

1.1 Características clínicas de los pacientes

Para realizar este estudio, analizamos un total de 28 muestras de corazones explantados de pacientes con MCI y 10 muestras CNT de corazones donantes sin enfermedad cardíaca. Las muestras de pacientes con MCI se seleccionaron de acuerdo a edad y características clínicas similares, y en función del número de datos clínicos disponibles. Para el análisis de secuenciación de ARN, todos los pacientes fueron varones con una media de edad de 54 ± 8 años. Para el análisis proteico, los pacientes fueron mayoritariamente varones (95%) con una media de edad de 54 ± 8 años. Los pacientes presentaban una clasificación funcional según la *NYHA* de III-IV, y fueron diagnosticados previamente con diversas comorbilidades tal y como se muestra en la Tabla 1. El grupo CNT utilizado en este estudio también estuvo formado mayoritariamente por varones (80%) con una media de edad de 47 ± 16 años. Todos los donantes CNT tenían función ventricular normal ($FE > 50\%$), determinada por eco-Doppler, y carecían de antecedentes de enfermedad cardíaca o infección activa en el momento de la obtención de la muestra. Estas muestras se obtuvieron de corazones de donantes que no fueron aptos para trasplante por incompatibilidad sanguínea o de tamaño. Para este grupo, la causa de muerte fue accidente cerebrovascular (68%) o accidente de tráfico (32%). Los datos ecocardiográficos del grupo CNT, así como sus

respectivas comorbilidades no fueron facilitados debido a la ley orgánica española de protección de datos 15/1999.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con miocardiopatía isquémica.

| | RNA-seq MCI (n=13) | W- blot MCI (n=28) |
|--|-----------------------|-----------------------|
| Edad (años) | 54 ± 8 | 54 ± 8 |
| Género masculino (%) | 100 | 95 |
| Clase NYHA | 3,6 ± 0,4 | 3,5 ± 0,4 |
| Fumadores (%) | 85 | 94 |
| IMC (kg/m²) | 27 ± 4 | 27 ± 4 |
| Colesterol total (mg/dl) | 162 ± 41 | 160 ± 38 |
| Hipertensión (%) | 31 | 44 |
| Diabetes mellitus (%) | 38 | 41 |
| Hemoglobina (mg/ml) | 14 ± 3 | 13 ± 3 |
| Hematocrito (%) | 41 ± 6 | 40 ± 7 |
| Duración de la enfermedad (meses) | 45 ± 40 | 55 ± 46 |
| FE (%) | 24 ± 4 | 24 ± 6 |
| FA (%) | 13 ± 2 | 13 ± 4 |
| DTSVI (mm) | 56 ± 8 | 55 ± 8 |
| DTDVI (mm) | 64 ± 8 | 63 ± 7 |
| IMVI (g/m²) | 139 ± 36 | 142 ± 43 |

Los datos se muestran como el valor medio ± la desviación estándar. *RNA-seq*, secuenciación de ARN; *W-blot*, *western blot*; MCI, miocardiopatía isquémica; *NYHA*, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; IMVI, índice de masa del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

1.2 Análisis de expresión génica

Mediante la técnica de secuenciación de ARN, analizamos las diferencias a nivel transcriptómico entre nuestro grupo de pacientes con MCI y el grupo utilizado como CNT. El número de lecturas total obtenido a partir del análisis de secuenciación de ARN fue 36.474.696, de las cuales 19.647.364 correspondieron a lecturas únicas del transcriptoma. Al comparar ambos grupos encontramos que en el grupo patológico 1334 genes estaban diferencialmente expresados, 649 sobre-expresados ($\geq 1,5\text{-fold}$; $P < 0,05$ para todos) y 685 infra-expresados ($\geq 1,5\text{-fold decrease}$; $P < 0,05$ para todos). De todos ellos, nos centramos en estudiar todos los genes de la familia del colágeno que se expresaban en esta cardiomiopatía. De los 43 genes encontrados (Tabla 2), 11 mostraban una expresión significativamente aumentada respecto del grupo CNT (Figura 1). Siguiendo la clasificación de Shoulders, M.D. *et. al.*⁶⁸, el 55% de los genes que codifican colágenos fibrilares tenían su expresión sobre-regulada. Dentro del grupo no fibrilar, el 15,63% de los genes mostraban una expresión diferencialmente aumentada, correspondiendo el 9,38% a la clase FACIT y el 6,25% a los colágenos formadores de redes. Los niveles de expresión de los genes de las clases MACIT, Multiplexinas, y Fibrillas de anclaje que se expresaban en el grupo de pacientes con MCI, no estaban significativamente alterados (Figura 2).

Tabla 2. Genes de la familia del colágeno expresados en la miocardiopatía isquémica.

| Clase | Tipo | Gen | Expresión absoluta | P-valor |
|----------------------|-------|----------------|--------------------|---------|
| Fibrilar | I | <i>COL1A1</i> | 1239 ± 515 | < 0,001 |
| | | <i>COL1A2</i> | 1265 ± 564 | < 0,01 |
| | II | <i>COL2A1</i> | 2,65 ± 1,78 | NS |
| | III | <i>COL3A1</i> | 1615 ± 972 | < 0,01 |
| | V | <i>COL5A1</i> | 329 ± 104 | < 0,01 |
| | | <i>COL5A2</i> | 264 ± 83 | < 0,01 |
| | | <i>COL5A3</i> | 294 ± 93 | NS |
| | XI | <i>COL11A1</i> | 3,31 ± 2,76 | NS |
| | | <i>COL11A2</i> | 36 ± 16 | < 0,05 |
| | XXIV | <i>COL24A1</i> | 24 ± 14 | NS |
| | XXVII | <i>COL27A1</i> | 288 ± 147 | NS |
| Formadores de redes | IV | <i>COL4A1</i> | 1611 ± 586 | < 0,01 |
| | | <i>COL4A2</i> | 1438 ± 312 | NS |
| | | <i>COL4A3</i> | 53 ± 23 | NS |
| | | <i>COL4A4</i> | 70 ± 28 | NS |
| | | <i>COL4A5</i> | 202 ± 79 | < 0,05 |
| | | <i>COL4A6</i> | 103 ± 29 | NS |
| | VI | <i>COL6A1</i> | 2281 ± 806 | NS |
| | | <i>COL6A2</i> | 1435 ± 453 | NS |
| | | <i>COL6A3</i> | 756 ± 175 | NS |
| | | <i>COL6A5</i> | 3,49 ± 2,99 | NS |
| | | <i>COL6A6</i> | 34 ± 27 | NS |
| | VIII | <i>COL8A1</i> | 203 ± 62 | < 0,05 |
| | | <i>COL8A2</i> | 14 ± 9 | NS |
| | X | <i>COL10A1</i> | 3,36 ± 3,62 | NS |
| FACIT | IX | <i>COL9A1</i> | 24 ± 16 | < 0,01 |
| | | <i>COL9A2</i> | 5,72 ± 3,85 | NS |
| | | <i>COL9A3</i> | 3,97 ± 3,33 | NS |
| | XII | <i>COL12A1</i> | 197 ± 95 | NS |
| | XIV | <i>COL14A1</i> | 116 ± 62 | < 0,05 |
| | XVI | <i>COL16A1</i> | 119 ± 27 | < 0,001 |
| | XIX | <i>COL19A1</i> | 5,89 ± 3,39 | NS |
| | XX | <i>COL20A1</i> | 2,88 ± 1,48 | NS |
| | XXI | <i>COL21A1</i> | 332 ± 108 | < 0,05 |
| | XXII | <i>COL22A1</i> | 5,03 ± 2,95 | NS |
| MACIT | XXVI | <i>COL26A1</i> | 2,34 ± 2,26 | NS |
| | XIII | <i>COL13A1</i> | 7,25 ± 4,21 | NS |
| | XVII | <i>COL17A1</i> | 2,15 ± 0,94 | NS |
| | XXIII | <i>COL23A1</i> | 89 ± 45 | NS |
| | XXV | <i>COL25A1</i> | 1,95 ± 1,81 | NS |
| Multiplexinas | XV | <i>COL15A1</i> | 612 ± 174 | NS |
| | XVIII | <i>COL18A1</i> | 523 ± 122 | NS |
| Fibrillas de anclaje | VII | <i>COL7A1</i> | 320 ± 134 | NS |

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. FACIT, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*; MACIT, *membrane-associated collagens with interrupted triple helices*; NS, no significativo.

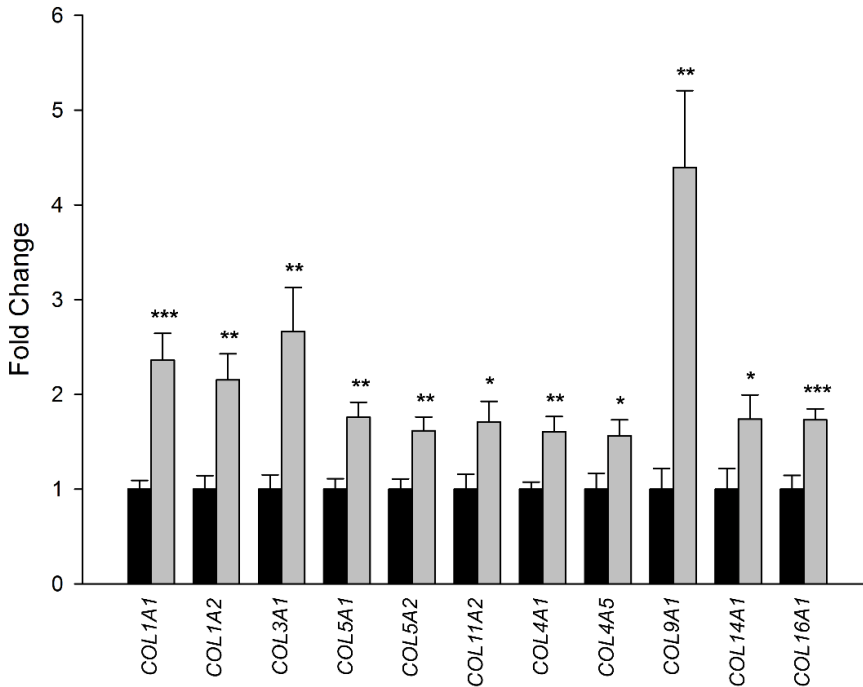


Figura 1. Niveles de expresión de los genes del colágeno alterados en corazones isquémicos. El gráfico de barras compara los niveles de expresión de ARNm de los genes del colágeno en corazones isquémicos (barras grises) frente a los controles (barras negras). Las barras muestran el valor de *Fold Change* \pm el error estándar de la media. Los valores de los controles se han establecido en 1. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

De esta manera, los genes alterados de la clase fibrilar representaban el 13,95% del total de genes del colágeno expresados mientras que los genes alterados de la clase no fibrilar representaron el 11,63% del total (Figura 2).

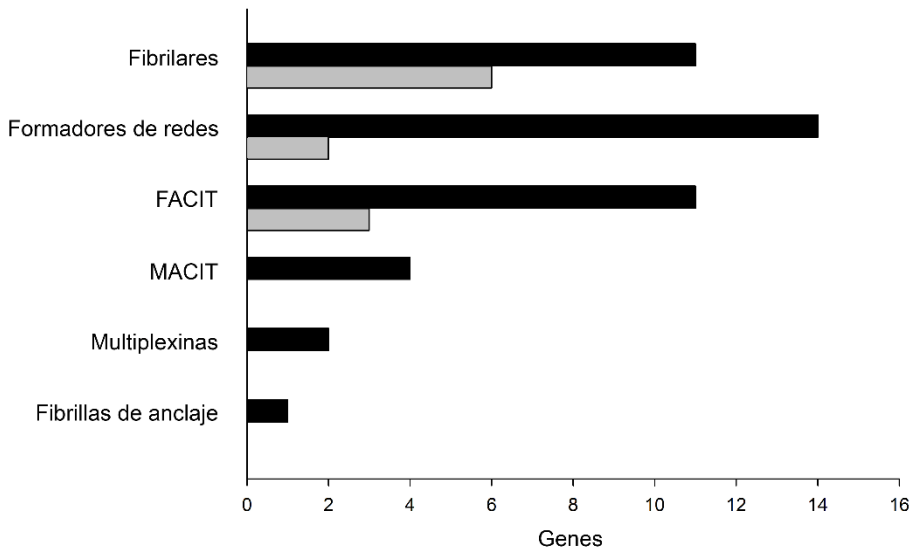


Figura 2. Clasificación de los genes del colágeno identificados por secuenciación de ARN en corazones isquémicos. El gráfico de barras muestra el número total de genes del colágeno identificados de cada clase (barras negras) con sus correspondientes genes alterados dentro de cada una (barras grises). FACIT, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*; MACIT, *membrane-associated collagens with interrupted triple helices*. Los genes del colágeno han sido ordenados conforme a la clasificación de Shoulders, M.D. *et. al.*⁶⁸.

Para visualizar los perfiles de expresión de estos genes en los pacientes con MCI y el grupo CNT, elaboramos un *Heat map* con *Hierarchical cluster* (Figura 3) que identificó dos perfiles de expresión divergentes, mostrando una clara separación de ambos grupos.

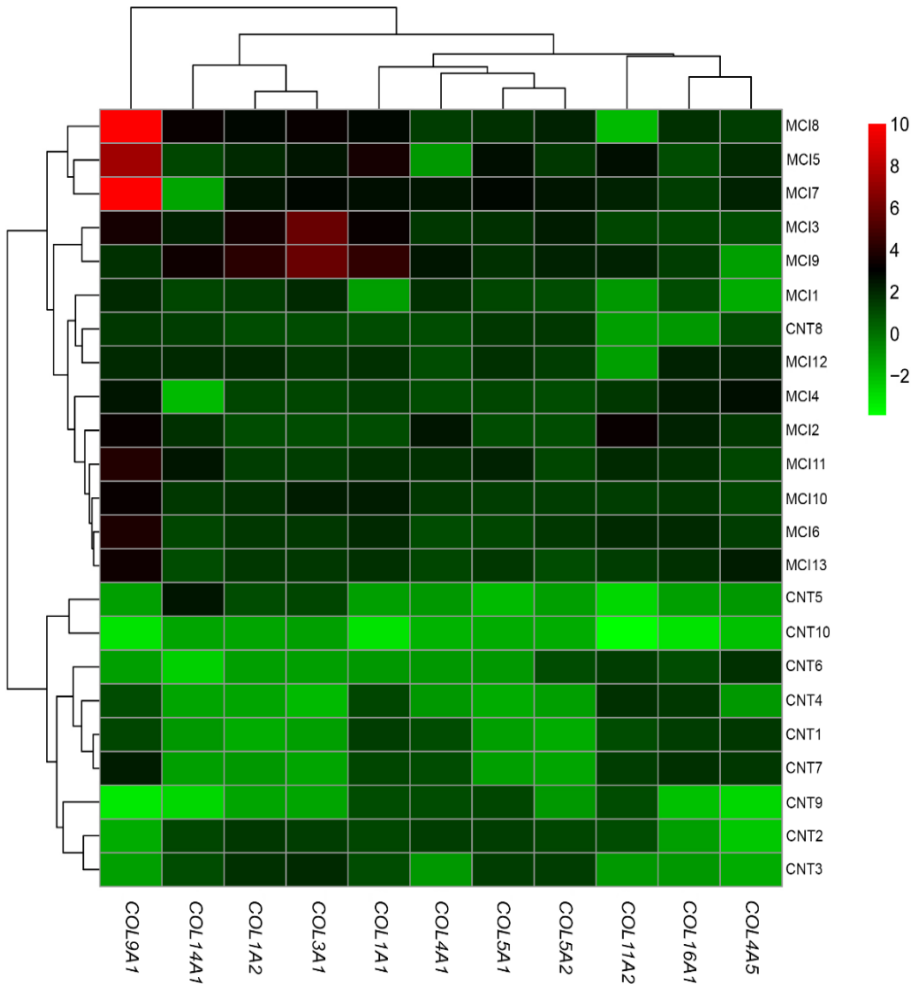


Figura 3. Heat map con Hierarchical cluster representando el perfil de expresión de los genes del colágeno alterados en la MCI. Heat map y Hierarchical clustering basado en los valores de *Fold Change* ($\geq 1,5$; $P < 0,05$) que muestra claramente la separación de los grupos MCI y CNT. Columnas: genes; filas: muestras. El color representa los niveles de expresión relativa de cada gen; verde: menor expresión; rojo: mayor expresión. MCI, miocardiopatía isquémica; CNT, control.

En base a la implicación de los colágenos en la proliferación, migración, diferenciación, en la organización y la morfología de los tejidos, fibrosis y apoptosis, también investigamos la expresión génica de conocidos marcadores moleculares de estos procesos. Como se muestra en la Tabla 3, encontramos marcadores sobre-expresados diferencialmente en todas las categorías.

Tabla 3. Niveles de expresión de ARNm de marcadores moleculares de proliferación, hipertrofia, fibrosis y apoptosis en la miocardiopatía isquémica.

| MARCADORES MOLECULARES | Gen | <i>Fold Change</i> | <i>P</i> -valor |
|------------------------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| PROLIFERACIÓN E HIPERTROFIA | <i>TGFβ1</i> | 1,05 | NS |
| | <i>TGFβ2</i> | 2,13 | < 0,05 |
| | <i>TGFβ3</i> | 1,33 | < 0,05 |
| | <i>MMP2</i> | 1,26 | < 0,05 |
| | <i>MMP9</i> | 1,26 | NS |
| | <i>ANP</i> | 10 | < 0,0001 |
| | <i>BNP</i> | 15 | < 0,01 |
| FIBROSIS | <i>COL1A2</i> | 2,15 | < 0,01 |
| | <i>COL3A1</i> | 2,66 | < 0,01 |
| APOPTOSIS | <i>CASP3</i> | 1,27 | NS |
| | <i>CASP9</i> | 1,39 | < 0,05 |

NS, no significativo.

1.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y remodelado ventricular

A continuación, investigamos las posibles relaciones entre los niveles de ARNm de los genes del colágeno que encontramos diferencialmente expresados y los parámetros de función y remodelado del ventrículo izquierdo para tratar de discernir la relevancia clínica de estas moléculas en la MCI. La fracción de acortamiento (FA) y los niveles de ARNm del gen *COL4A5* mostraron una relación significativa e inversa ($r = -0,694$, $P < 0,05$) (Figura 4). Asimismo, se observó que tanto el diámetro tele-sistólico ($r = 0,678$, $P < 0,05$) como el diámetro tele-diastólico ($r = 0,687$, $P < 0,05$) se relacionaban de manera directa y significativa con la expresión del gen *COL16A1* (Figura 5).

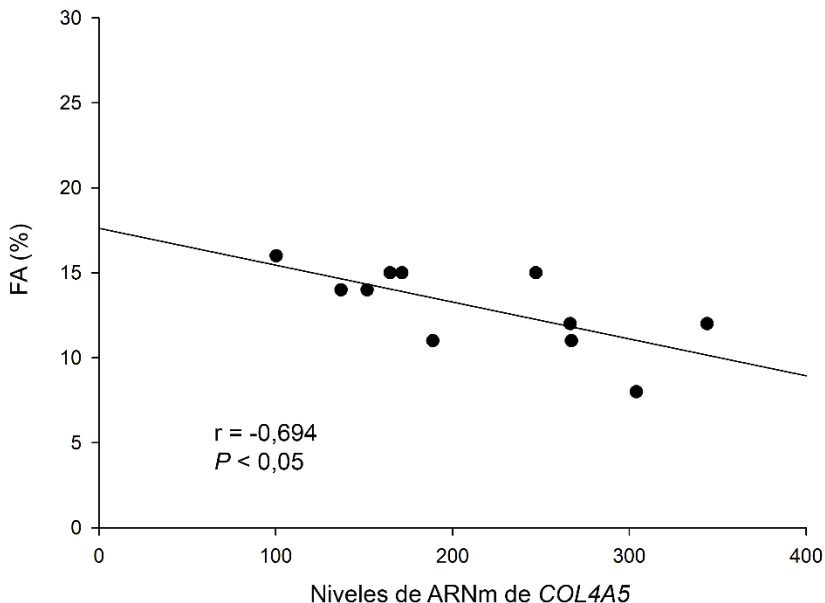
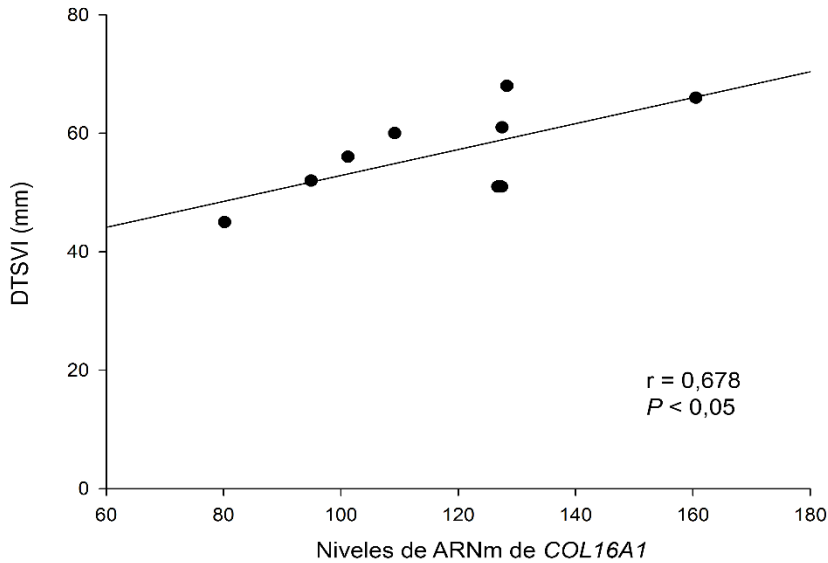


Figura 4. Relación entre los niveles de expresión del gen *COL4A5* y la FA en pacientes con MCI. FA, fracción de acortamiento; MCI, miocardiopatía isquémica.

A)



B)

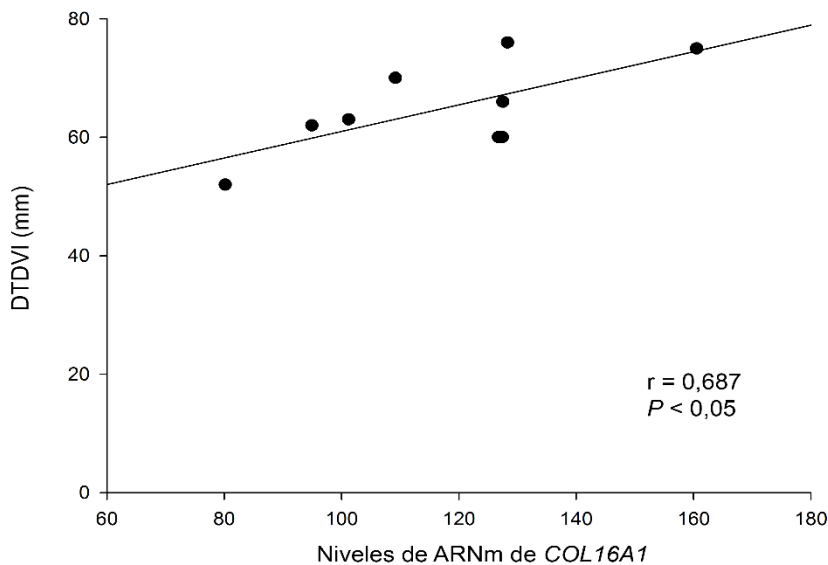


Figura 5. Relación entre los niveles de expresión del gen *COL16A1* y el DTSVI (A) y DTDVI (B) en pacientes con MCI. DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; MCI, miocardiopatía isquémica.

1.4 Validación por *RT-qPCR* de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular

Para validar los datos obtenidos por secuenciación de ARN, utilizamos la técnica de *RT-qPCR* (Figura 6) centrándonos en aquellos colágenos diferencialmente expresados y relacionados con parámetros de disfunción ventricular (*COL4A5* y *COL16A1*), así como en uno de los nuevos colágenos no fibrilares descritos y que podría tener un papel relevante en los procesos de hipertrofia y fibrosis (*COL14A1*).

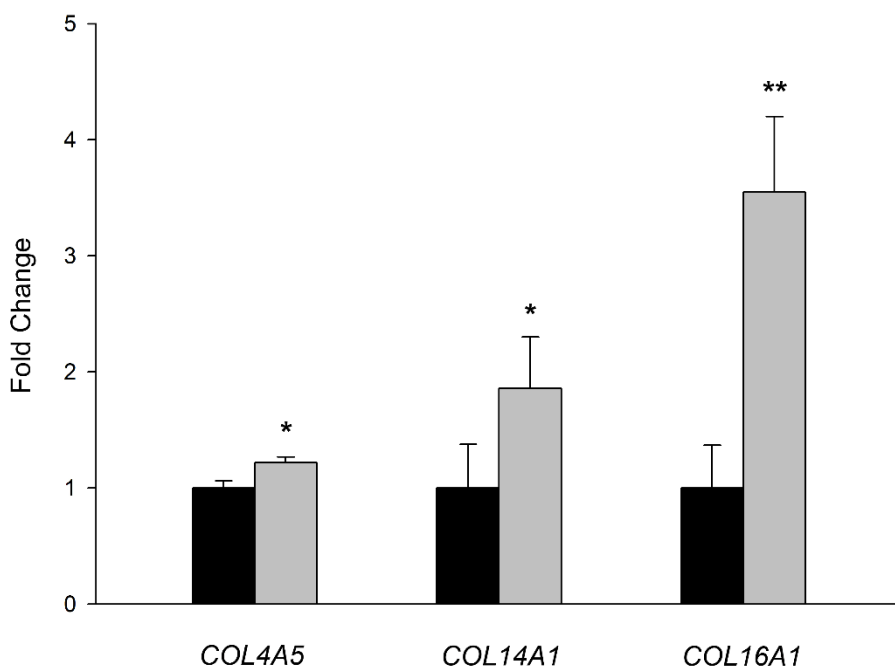


Figura 6. Validación de la expresión génica alterada de *COL4A5*, *COL14A1* y *COL16A1* en la miocardiopatía isquémica. La expresión diferencial de estos genes fue validada por *RT-qPCR* en corazones isquémicos (barras grises). Las barras muestran el valor de *Fold Change* \pm el error estándar de la media. Los valores de los controles (barras negras) se han establecido en 1. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

Los resultados de *RT-qPCR* confirmaron la sobre-expresión diferencial de estos tres genes con una significación de $P < 0,05$ para los genes *COL4A5* y *COL14A1* (1,22-*fold* y 1,86-*fold*, respectivamente) y una significación de $P < 0,01$ para el gen *COL16A1* (3,55-*fold*).

1.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular

Para determinar si los resultados encontrados a nivel de expresión génica se traducían en una expresión proteica diferencial, se analizó la expresión de estas proteínas mediante la técnica de *western blot*. Cuando comparamos los niveles proteicos entre muestras de corazones con MCI frente a las muestras de sujetos CNT, encontramos una expresión aumentada de *COL4A5* (131 ± 7 vs. 100 ± 6 unidades arbitrarias [UA], $P < 0,05$), *COL14A1* (142 ± 8 vs. 100 ± 9 UA, $P < 0,05$) y *COL16A1* (174 ± 19 vs. 100 ± 13 UA, $P < 0,01$), lo que va en concordancia con los resultados de expresión génica previamente obtenidos. Los niveles proteicos de estos colágenos no fibrilares se muestran en la Figura 7.

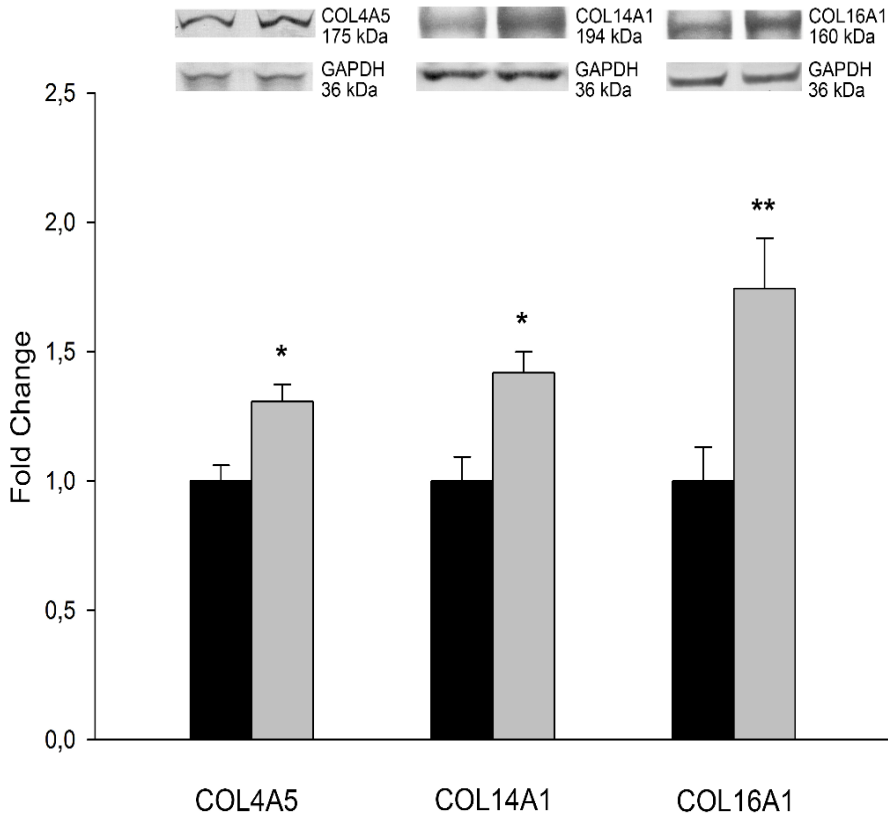


Figura 7. Niveles de expresión proteica de COL4A5, COL14A1, y COL16A1 en la miocardiopatía isquémica. Gráfico de barras que compara los niveles de COL4A5, COL14A1 y COL16A1 en corazones isquémicos (barras grises) frente a controles (barras negras). Los valores de los controles se han establecido en 1. Las barras muestran el valor de *Fold Change* \pm el error estándar de la media. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $*P < 0,05$ y $**P < 0,01$.

1.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco

Por la probable implicación de los colágenos no fibrilares IV, XIV, y XVI en los procesos de proliferación, hipertrofia, fibrosis y apoptosis, nos planteamos investigar posibles relaciones entre los niveles de expresión de estos genes y de establecidos marcadores moleculares de dichos procesos biológicos. De esta forma, encontramos correlaciones directas y significativas entre estos colágenos y marcadores moleculares conocidos de proliferación e hipertrofia (*COL14A1* vs. *TGF- β 2*, $r = 0,692$, $P < 0,01$) y fibrosis (*COL4A5* vs. *COL1A2*, $r = 0,693$, $P < 0,05$; *COL4A5* vs. *COL3A1*, $r = 0,666$, $P < 0,05$; *COL14A1* vs. *COL1A2*, $r = 0,704$, $P < 0,05$; *COL14A1* vs. *COL3A1*, $r = 0,601$, $P < 0,05$). Adicionalmente, observamos relaciones directas y significativas entre los colágenos IV, XIV y XVI (*COL4A5* vs. *COL16A1*, $r = 0,769$, $P < 0,01$; *COL14A1* vs. *COL16A1*, $r = 0,512$, $P < 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Relaciones entre los colágenos no fibrilares COL4A5, COL14A1 y COL16A1, y establecidos marcadores moleculares de proliferación e hipertrofia y fibrosis a nivel génico y proteico en pacientes con miocardiopatía isquémica.

| | Gen | COL4A5 | COL14A1 | COL16A1 |
|-----------------------------|----------------|-------------|--------------|--------------|
| SECUENCIACIÓN DE ARN | <i>TGFβ2</i> | NS | r = 0,692** | NS |
| | <i>COL1A1</i> | r = 0,710* | r = 0,556* | NS |
| | <i>COL1A2</i> | r = 0,693* | r = 0,704* | NS |
| | <i>COL3A1</i> | r = 0,666* | r = 0,601* | NS |
| | <i>COL4A5</i> | — | NS | r = 0,769** |
| | <i>COL14A1</i> | NS | — | NS |
| | <i>COL16A1</i> | r = 0,769** | NS | — |
| RT-qPCR | <i>COL4A5</i> | — | NS | NS |
| | <i>COL14A1</i> | NS | — | r = 0,720*** |
| | <i>COL16A1</i> | NS | r = 0,720*** | — |
| WESTERN BLOT | <i>COL4A5</i> | — | NS | NS |
| | <i>COL14A1</i> | NS | — | r = 0,512* |
| | <i>COL16A1</i> | NS | r = 0,512* | — |

NS, no significativo; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

2.1 Características clínicas de los pacientes

Para llevar a cabo este estudio, analizamos un total de 28 muestras de corazones explantados de pacientes diagnosticados de MCD y muestras CNT provenientes de 10 corazones de donantes sin enfermedad cardíaca. Las muestras de pacientes con MCD se seleccionaron de acuerdo a edad y características clínicas similares, y en función del número de datos clínicos disponibles. Los pacientes fueron mayoritariamente varones tanto para el análisis de secuenciación de ARN (92%) como para el análisis proteico (74%), con una media de edad de 51 ± 11 años y 49 ± 13 años, respectivamente. Los pacientes tenían una clasificación funcional de III-IV según la *NYHA* y fueron previamente diagnosticados con diversas comorbilidades tal y como se muestra en la Tabla 5. El grupo CNT utilizado en este estudio estuvo formado mayoritariamente por varones (80%) con una media de edad de 47 ± 16 años. Los datos ecocardiográficos de este grupo de donantes control, así como sus respectivas comorbilidades no fueron facilitados debido a la ley orgánica española de protección de datos 15/1999. Las características clínicas de los pacientes con MCD se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con miocardiopatía dilatada.

| | RNA-seq MCD (n=13) | W-blot MCD (n=28) |
|--|-----------------------|----------------------|
| Edad (años) | 51 ± 11 | 49 ± 13 |
| Género masculino (%) | 92 | 74 |
| Clase NYHA | 3,4 ± 0,4 | 3,3 ± 0,4 |
| Fumadores (%) | 50 | 61 |
| IMC (kg/m²) | 27 ± 5 | 25 ± 6 |
| Colesterol total (mg/dl) | 147 ± 37 | 142 ± 41 |
| Hipertensión (%) | 17 | 31 |
| Diabetes mellitus (%) | 17 | 18 |
| Hemoglobina (mg/ml) | 13 ± 3 | 13 ± 3 |
| Hematocrito (%) | 39 ± 8 | 40 ± 7 |
| Duración de la enfermedad (meses) | 75 ± 68 | 71 ± 59 |
| FE (%) | 20 ± 7 | 21 ± 8 |
| FA (%) | 11 ± 4 | 11 ± 5 |
| DTSVI (mm) | 71 ± 12 | 65 ± 12 |
| DTDVI (mm) | 80 ± 11 | 74 ± 11 |
| IMVI (g/m²) | 241 ± 77 | 206 ± 67 |

Los datos se muestran como el valor medio ± la desviación estándar. *RNA-seq*, secuenciación de ARN; *W-blot*, *western blot*; MCD, miocardiopatía dilatada; *NYHA*, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; IMVI, índice de masa del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

2.2 Análisis de expresión génica

Las diferencias a nivel transcriptómico entre las muestras de pacientes con MCD e individuos CNT fueron analizadas usando la técnica de alta sensibilidad de secuenciación de ARN. El número total de lecturas obtenido a partir del análisis de secuenciación de ARN fue 36.688.217, de las cuales 21.542.840 correspondieron a lecturas únicas del transcriptoma. Cuando comparamos el grupo de MCD con el grupo CNT encontramos 1628 genes diferencialmente expresados, de los cuales 596 estaban sobre-expresados ($\geq 1,5\text{-fold}$; $P < 0,05$ para todos) y 1032 estaban infra-expresados ($\geq 1,5\text{-fold decrease}$; $P < 0,05$ para todos) en el grupo patológico. Centrándonos en la familia del colágeno (Tabla 6), observamos 8 genes cuya expresión se encontraba diferencialmente aumentada ($\geq 1,5\text{-fold}$; $P < 0,05$ para todos) en esta cardiomiopatía respecto del grupo CNT. Los valores de *Fold Change* representativos de los niveles de expresión de los genes del colágeno alterados se muestran en la Figura 8.

Tabla 6. Genes de la familia del colágeno expresados en la miocardiopatía dilatada.

| Clase | Tipo | Gen | Expresión absoluta | P valor |
|----------------------|-------|---------|--------------------|---------|
| Fibrilar | I | COL1A1 | 700 ± 329 | NS |
| | | COL1A2 | 1106 ± 579 | < 0,05 |
| | II | COL2A1 | 1,75 ± 1,19 | NS |
| | III | COL3A1 | 1033 ± 543 | < 0,05 |
| | V | COL5A1 | 257 ± 96 | NS |
| | | COL5A2 | 185 ± 61 | NS |
| | | COL5A3 | 250 ± 71 | NS |
| | XI | COL11A1 | 2,27 ± 1,41 | NS |
| | | COL11A2 | 23 ± 12 | NS |
| | XXIV | COL24A1 | 22 ± 8 | NS |
| | XXVII | COL27A1 | 206 ± 91 | NS |
| Formadores de redes | IV | COL4A1 | 1175 ± 290 | NS |
| | | COL4A2 | 1361 ± 367 | NS |
| | | COL4A3 | 55 ± 30 | NS |
| | | COL4A4 | 62 ± 30 | NS |
| | | COL4A5 | 231 ± 63 | < 0,01 |
| | | COL4A6 | 110 ± 21 | NS |
| | VI | COL6A1 | 1901 ± 605 | NS |
| | | COL6A2 | 1118 ± 305 | NS |
| | | COL6A3 | 704 ± 216 | NS |
| | | COL6A5 | 2,42 ± 1,30 | NS |
| | | COL6A6 | 15 ± 9 | NS |
| | VIII | COL8A1 | 257 ± 103 | < 0,01 |
| | | COL8A2 | 13 ± 6 | NS |
| | X | COL10A1 | 2,69 ± 1,77 | NS |
| FACIT | IX | COL9A1 | 22 ± 21 | < 0,05 |
| | | COL9A2 | 6,07 ± 3,75 | NS |
| | | COL9A3 | 5,67 ± 5,24 | NS |
| | XII | COL12A1 | 201 ± 65 | NS |
| | XIV | COL14A1 | 94 ± 43 | NS |
| | XVI | COL16A1 | 141 ± 56 | < 0,01 |
| | XIX | COL19A1 | 9,78 ± 6,18 | NS |
| | XX | COL20A1 | 2,08 ± 1,24 | NS |
| | XXI | COL21A1 | 378 ± 106 | < 0,01 |
| | XXII | COL22A1 | 5,31 ± 2,44 | NS |
| MACIT | XXVI | COL26A1 | 2,37 ± 1,73 | NS |
| | XIII | COL13A1 | 5,08 ± 2,44 | NS |
| | XVII | COL17A1 | 1,55 ± 0,69 | NS |
| | XXIII | COL23A1 | 108 ± 45 | < 0,05 |
| | XXV | COL25A1 | 1,21 ± 0,39 | NS |
| Multiplexinas | XV | COL15A1 | 599 ± 264 | NS |
| | XVIII | COL18A1 | 455 ± 98 | NS |
| Fibrillas de anclaje | VII | COL7A1 | 326 ± 130 | NS |

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. FACIT, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*; MACIT, *membrane-associated collagens with interrupted triple helices*; NS, no significativo.

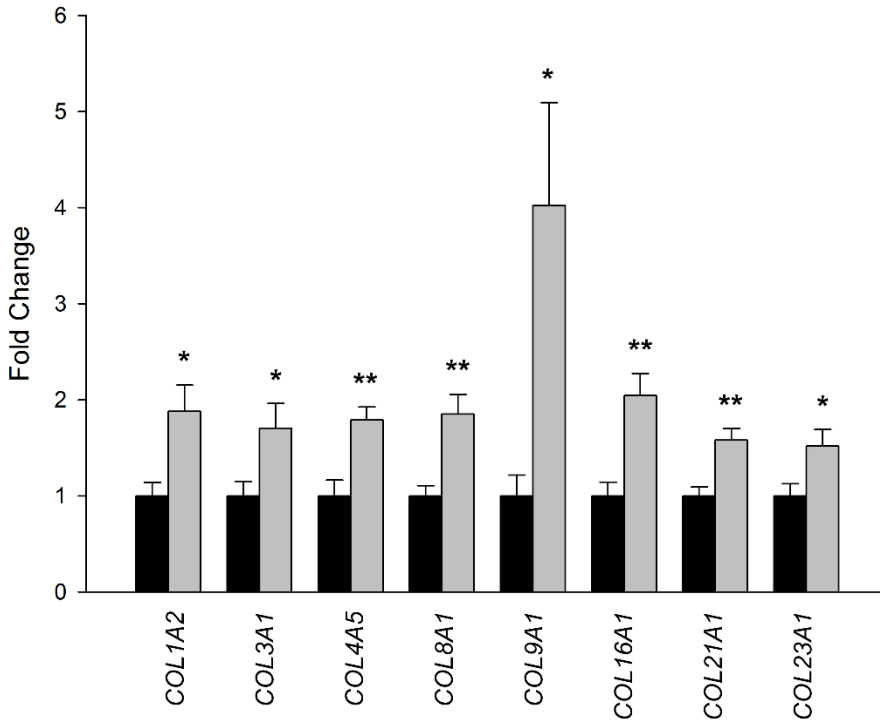


Figura 8. Alteración en los niveles de expresión de los genes del colágeno en corazones dilatados. El gráfico de barras compara los niveles de expresión de ARNm de los genes del colágeno en corazones dilatados (barras grises) frente a controles (barras negras). Los valores del grupo control se han establecido en 1. Las barras muestran el valor de *Fold Change* \pm el error estándar de la media. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

De estos 8 genes diferencialmente expresados, 6 pertenecen a clases no fibrilares tales como los colágenos formadores de redes (*COL4A5* y *COL8A1*), la clase FACIT (*COL9A1*, *COL16A1*, y *COL21A1*) y la clase MACIT (*COL23A1*).

Dentro de la clase no fibrilar, el 18,75% de los genes mostraban una expresión diferencialmente aumentada, correspondiendo el 9,38% a la clase FACIT, el 6,25% a los colágenos formadores de redes y el 3,12% a la clase MACIT. Los niveles de expresión de los genes encontrados de las clases Multiplexinas y Fibrillas de anclaje no estaban significativamente alterados (Figura 9). De esta manera, los colágenos no fibrilares representaron el 13,90% de genes alterados respecto del total de genes del colágeno expresados en esta cardiomiopatía, mientras que los colágenos fibrilares alterados solo representaron el 4,65%.

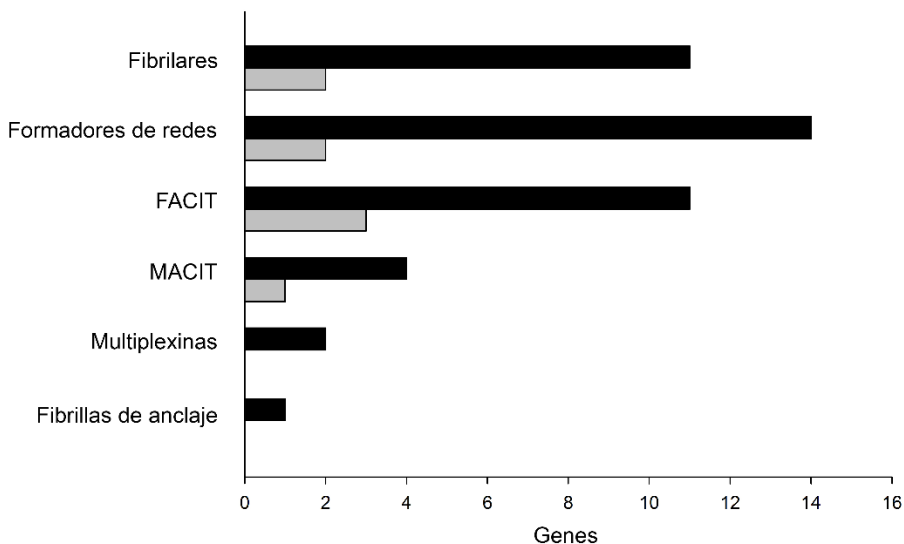


Figura 9. Clasificación de los genes del colágeno identificados por secuenciación de ARN en corazones dilatados. El gráfico de barras muestra el número total de genes del colágeno identificados de cada clase (barras negras) con sus correspondientes genes alterados dentro de cada una (barras grises). FACIT, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*; MACIT, *membrane-associated collagens with interrupted triple helices*. Los genes del colágeno han sido ordenados conforme a la clasificación de Shoulders, M.D. *et. al.*⁶⁸.

Dado el mayor porcentaje de colágenos no fibrilares alterados y los hallazgos previos encontrados en la MCI, nos centramos en este grupo de colágenos para realizar un análisis de componentes principales (PCA) y así comparar los valores de expresión de estos genes sobre-expresados en la MCD frente al grupo CNT. A pesar de observarse cierto solapamiento, el análisis identificó dos perfiles de expresión génica divergentes, diferenciando de manera clara el grupo patológico del grupo CNT (Figura 10).

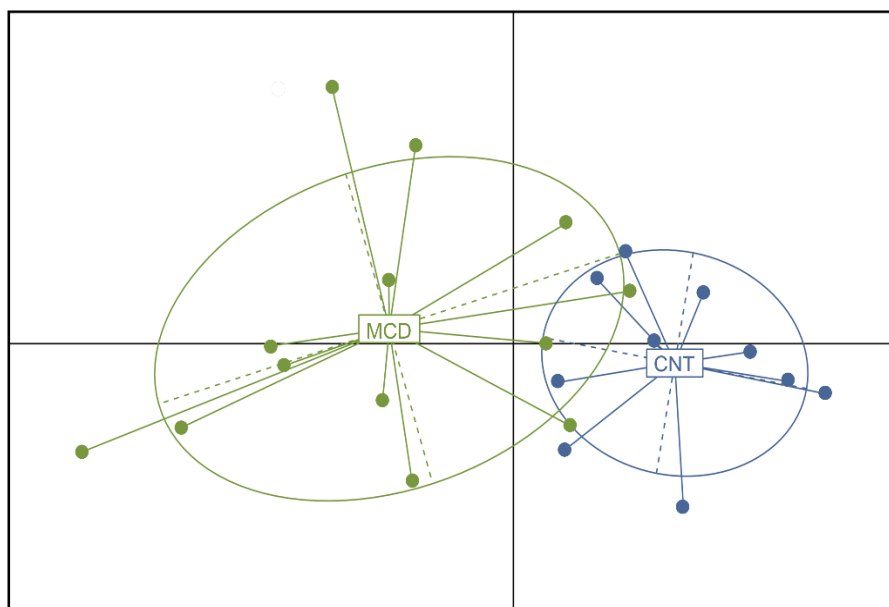


Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los genes del colágeno alterados en la MCD. PCA basado en los valores de *Fold Change* ($\geq 1,5$; $P < 0,05$) de los genes que codifican colágenos no fibrilares, y que muestra una clara diferenciación entre el grupo de MCD y el grupo CNT. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control.

En vista de la implicación de los colágenos en la proliferación, migración, diferenciación, en la organización y la morfología de los tejidos, fibrosis y apoptosis, también investigamos la expresión génica de conocidos marcadores moleculares de estos procesos (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de expresión de ARNm de marcadores moleculares de proliferación, hipertrofia, fibrosis y apoptosis en la miocardiopatía dilatada.

| MARCADORES MOLECULARES | Gen | Fold Change | P-valor |
|------------------------------------|---------------|--------------------|----------------|
| PROLIFERACIÓN E HIPERTROFIA | <i>TGFβ1</i> | 1,04 | NS |
| | <i>TGFβ2</i> | 2,20 | < 0,05 |
| | <i>TGFβ3</i> | 1,32 | < 0,01 |
| | <i>MMP2</i> | 1,31 | < 0,05 |
| | <i>MMP9</i> | 0,34 | NS |
| | <i>ANP</i> | 32 | < 0,0001 |
| | <i>BNP</i> | 24 | < 0,01 |
| FIBROSIS | <i>COL1A2</i> | 1,88 | < 0,05 |
| | <i>COL3A1</i> | 1,70 | < 0,05 |
| APOPTOSIS | <i>CASP3</i> | 1,32 | < 0,05 |
| | <i>CASP9</i> | 1,33 | < 0,05 |

NS, no significativo.

Como se muestra en la Tabla 7, encontramos una expresión diferencialmente aumentada de los marcadores moleculares en todas las categorías.

2.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y el remodelado ventricular

A continuación, analizamos las posibles relaciones entre los niveles de expresión de ARNm de los genes codificantes de colágenos no fibrilares diferencialmente expresados y los parámetros de función y remodelado del VI en el grupo de MCD. Observamos una correlación directa y significativa entre el *COL8A1* y el índice de masa ventricular izquierdo ($r = 0,653$, $P < 0,05$) (Figura 11).

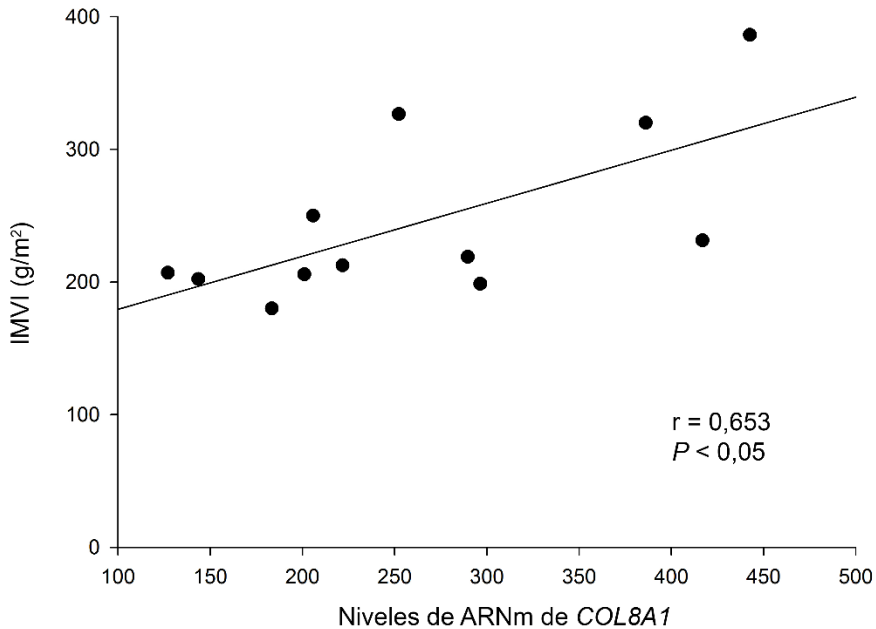


Figura 11. Relación entre los niveles de expresión del gen *COL8A1* y el IMVI en pacientes con MCD. IMVI, Índice de masa ventricular izquierdo; MCD, miocardiopatía dilatada.

2.4 Validación por *RT-qPCR* de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular

Para validar los datos obtenidos por secuenciación de ARN, utilizamos la técnica de *RT-qPCR* centrándonos en *COL8A1*, diferencialmente expresado y relacionado con parámetros de remodelado cardiaco, y en *COL16A1*, uno de los nuevos colágenos no fibrilares descritos y relacionados con disfunción ventricular en la MCI. Tal y como se muestra en la Figura 12, los resultados de *RT-qPCR* confirmaron la sobre-expresión diferencial de estos genes (2,02-fold, $P < 0,01$ y 2,45-fold, $P < 0,001$, respectivamente).

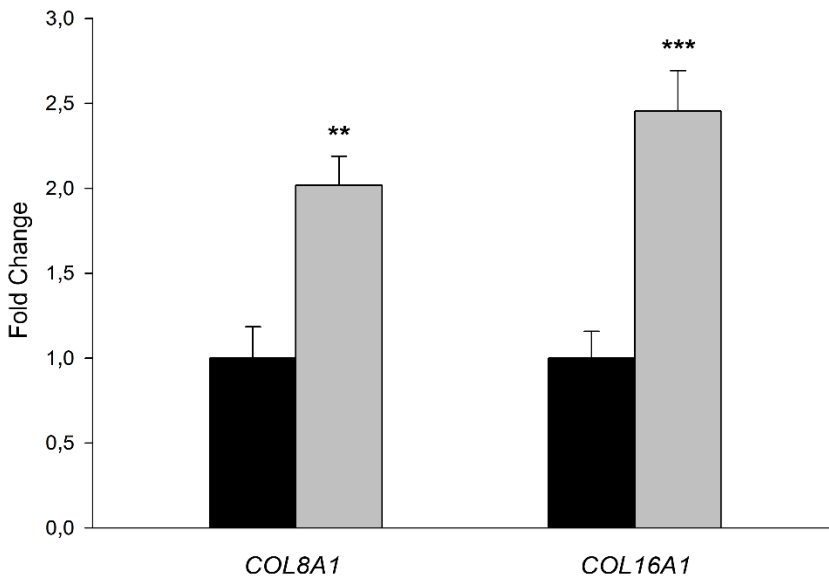


Figura 12. Validación de la expresión génica alterada de *COL8A1* y *COL16A1* en la miocardiopatía dilatada. La expresión diferencial de estos genes fue validada por *RT-qPCR* en corazones dilatados (barras grises). Las barras muestran el valor de *Fold Change* \pm el error estándar de la media. Los valores de los controles (barras negras) se han establecido en 1. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

2.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular

Para determinar si los resultados de expresión génica se traducían en cambios en los niveles de proteína, se realizaron análisis de expresión proteica por *western blot*. Los niveles de proteína tanto de COL8A1 como de COL16A1 estaban aumentados en el grupo de pacientes con MCD respecto del grupo CNT (142 ± 16 vs. 100 ± 11 UA, $P < 0,05$; 148 ± 11 vs. 100 ± 12 UA, $P < 0,05$, respectivamente), tal y como podría inferirse de los resultados previos de secuenciación de ARN y *RT-qPCR* (Figura 13A).

Además de estas proteínas, por el papel del TGF- β 1 en la propagación *downstream* de señales intracelulares en una gran variedad de procesos biológicos como es la biosíntesis de colágeno, por sus efectos pleiotrópicos y por la participación tanto del TGF- β 1 como de la MMP-2 en el metabolismo del colágeno, decidimos investigar la expresión proteica de estas dos moléculas. Aunque encontramos niveles aumentados de ambas proteínas en las muestras de pacientes con MCD respecto del grupo CNT (Figura 13B), sólo se obtuvieron diferencias significativas para el TGF- β 1 (150 ± 10 vs. 100 ± 24 UA, $P < 0,05$).

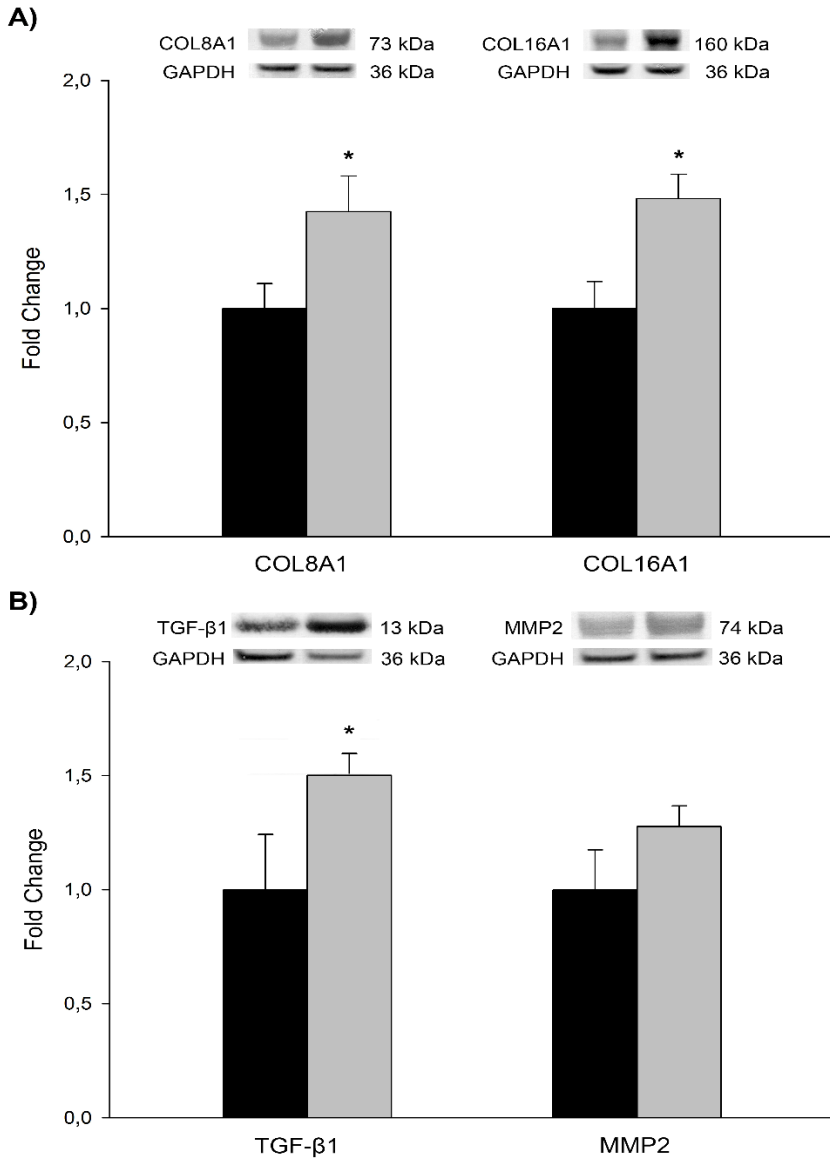


Figura 13. Niveles de expresión proteica de COL8A1, COL16A1, TGF-β1, y MMP2 en la miocardiopatía dilatada. Gráfico de barras que compara los niveles de COL8A1 y COL16A1 (A) y los niveles de TGF-β1 y MMP2 (B) en corazones dilatados (barras grises) frente a controles (barras negras). Los valores de los controles se han establecido en 1. Las barras muestran el valor de *Fold Change* ± el error estándar de la media. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $*P < 0,05$.

2.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco

Por la probable implicación del colágeno VIII y XVI en los procesos de proliferación, hipertrofia, fibrosis y apoptosis, nos planteamos investigar posibles relaciones entre los niveles de expresión de estos genes y de establecidos marcadores moleculares de dichos procesos biológicos. De esta forma, encontramos correlaciones directas y significativas entre *COL8A1* y marcadores moleculares conocidos de apoptosis y fibrosis (*COL8A1* vs. *CASP3*, $r = 0,735$, $P < 0,01$; *COL8A1* vs. *COL1A2*, $r = 0,708$, $P < 0,01$) y entre *COL16A1* y algunos de los colágenos no fibrilares significativamente alterados respecto del grupo CNT (*COL16A1* vs. *COL4A5*, $r = 0,641$, $P < 0,05$; *COL16A1* vs. *COL9A1*, $r = 0,697$, $P < 0,01$; *COL16A1* vs. *COL21A1*, $r = 0,634$, $P < 0,05$). Adicionalmente, observamos diversas relaciones significativas a nivel proteico entre *COL8A1*, *COL16A1* y uno de los principales efectores en los procesos de proliferación, hipertrofia y fibrosis, el TGF- β 1 (*COL8A1* vs. *COL16A1*, $r = 0,452$, $P < 0,05$; *COL8A1* vs. TGF- β 1, $r = 0,433$, $P < 0,05$, *COL16A1* vs. TGF- β 1, $r = 0,477$, $P < 0,05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Relaciones entre los colágenos no fibrilares COL8A1 y COL16A1 y establecidos marcadores moleculares de proliferación e hipertrofia, fibrosis y apoptosis a nivel génico y proteico en pacientes con miocardiopatía dilatada.

| | Gen | COL8A1 | COL16A1 |
|----------------------|----------------|--------------|--------------|
| SECUENCIACIÓN DE ARN | <i>TGFβ1</i> | NS | NS |
| | <i>COL1A2</i> | r = 0,708** | NS |
| | <i>COL4A5</i> | NS | r = 0,641* |
| | <i>COL9A1</i> | NS | r = 0,697** |
| | <i>COL21A1</i> | NS | r = 0,634* |
| | <i>CASP3</i> | r = 0,735** | NS |
| RT-qPCR | <i>COL8A1</i> | — | r = 0,813*** |
| | <i>COL16A1</i> | r = 0,813*** | — |
| WESTERN BLOT | <i>TGFβ1</i> | r = 0,433* | r = 0,477* |
| | <i>COL8A1</i> | — | r = 0,452* |
| | <i>COL16A1</i> | r = 0,452* | — |

NS, no significativo; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.



DISCUSIÓN

1. ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA

La IC es un importante problema de salud pública asociado con un mal pronóstico y un alto índice de mortalidad¹⁸⁵. En la actualidad, la causa más frecuente de IC es la MCI. En la MCI, se producen cambios en la morfología, composición relativa e interacciones entre los componentes del tejido cardiaco y vascular. Este proceso de remodelado se produce inicialmente como una respuesta compensatoria en un intento de preservar la integridad estructural del miocardio. En consecuencia, tiene lugar la síntesis de colágeno y formación de la cicatriz fibrótica que proporciona la fuerza de tensión necesaria para prevenir la ruptura del tejido; pero la constante activación de estos mecanismos de compensación puede desencadenar el deterioro progresivo de la función cardiaca^{10, 26, 67}.

Teniendo en cuenta la participación de los colágenos en los procesos de fibrosis, nos propusimos identificar qué genes del colágeno se expresan y cuáles de ellos muestran patrones de expresión alterados en los pacientes con MCI, además de investigar cómo la expresión de estos genes podría estar relacionada con la función ventricular. Mediante la técnica de secuenciación de ARN, identificamos 11 genes codificantes de colágenos que se sobre-expresaban en pacientes con MCI, mostrando alguno de estos genes relaciones estadísticamente significativas con parámetros de función y remodelado ventricular. Estos resultados son consistentes con estudios previos que vinculan el aumento de expresión de genes del colágeno con procesos fibróticos²⁸,

^{146, 186}. De los 28 tipos de colágeno descritos en la actualidad, los tipos I, III, IV, V, y VI han sido encontrados significativamente sobre-expresados en estudios previos, siendo los tipos I y III conocidos marcadores de fibrosis miocárdica ¹²⁸. De igual manera, encontramos niveles de ARNm de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL4A5*, *COL5A1*, *COL5A2* significativamente aumentados en nuestras muestras de pacientes con MCI respecto a las muestras CNT. Por el contrario, ninguno de los genes de la familia del colágeno VI identificados en nuestro estudio mostró un aumento diferencial y significativo de la expresión génica.

Colágeno IV, glucoproteínas, y proteoglucanos son componentes mayoritarios de la membrana basal que rodea los miocitos cardiacos. En un modelo experimental de rata a la que se induce un infarto de miocardio, se observó como en los primeros días tras el infarto el aumento de este colágeno en la propia zona dañada era menor que en el área circundante, además no se depositaba de forma organizada tal y como se esperaría por ser componente de la membrana basal. En dicho estudio se sugirió que la ausencia inicial de colágeno tipo IV en la zona de infarto permitía la eliminación de los cardiomiocitos necróticos y la migración de fibroblastos hacia el área dañada^{187, 188}. En consecuencia, dados nuestros resultados proponemos que, en pacientes con MCI, la expresión anormal de colágeno IV podría facilitar los procesos de eliminación de cardiomiocitos necróticos y posterior migración de fibroblastos, mecanismos que forman parte del proceso de fibrosis cardiaca.

En cuanto a la función específica del colágeno tipo V, en tejido cardíaco no está bien definida. Sin embargo, el aumento de la expresión de este colágeno se ha observado en la aterosclerosis, en la MCD y en la formación de la cicatriz fibrótica^{189, 190}. Su sobre-expresión en la MCI podría estar relacionada con las funciones de este colágeno en la organización y formación de fibrillas heterotípicas, principalmente con el colágeno I, cuya síntesis diferencialmente aumentada ha sido ampliamente descrita en el proceso fibrótico que tiene lugar durante el remodelado cardíaco y acordemente observada en nuestro estudio.

Además de estos colágenos, también encontramos un incremento significativo de la expresión del colágeno fibrilar XI, y de los tipos IX, XIV y XVI pertenecientes a la clase FACIT. De manera similar al colágeno V, el colágeno XI puede promover la nucleación de fibrillas de tipo I y II, además de ser necesario para la morfogénesis miocárdica y el desarrollo de las válvulas cardíacas^{130, 191}. En nuestro estudio, al igual que *COL5A1*, hallamos niveles de ARNm de *COL11A2* significativamente aumentados en las muestras de MCI.

Los otros colágenos pertenecientes a la clase FACIT, se expresan de manera habitual en tejidos que experimentan elevada tensión mecánica, ese es el caso del tejido cardíaco. En este tejido, las fibrillas de colágeno se organizan a fin de proporcionar resistencia a la tracción en respuesta a cambios en la carga hemodinámica y para maximizar la transmisión de fuerza durante el ciclo cardíaco^{192, 193}. El colágeno IX es un componente importante del cartílago, debido a su naturaleza flexible¹⁹⁴. Este tipo de colágeno se cree que es necesario para procesos como el

desarrollo de ojos y corazón¹⁹⁵. En algunas patologías, la falta de colágeno tipo IX interrumpe el desarrollo de los tejidos conectivos. Sin embargo, los niveles aumentados del colágeno IX se han observado en patologías como “*pectus excavatum*” y más recientemente en el matrisoma del ventrículo derecho en la insuficiencia cardiaca humana^{196, 197}. En nuestro estudio encontramos niveles aumentados de ARNm de *COL9A1*. A la luz de estas investigaciones y teniendo en cuenta nuestros resultados proponemos que la sobre-expresión de *COL9A1* podría conducir a un aumento de la rigidez del tejido cardiaco y estar potencialmente implicada en el proceso de remodelado.

Respecto a los colágenos XIV y XVI, podrían ser mediadores fundamentales del proceso de fibrosis cardiaca. Estudios previos sugieren que el colágeno XIV se requiere para establecer y mantener un entorno extracelular equilibrado y organizado en el miocardio en desarrollo, y que participa en la regulación del crecimiento de los cardiomiocitos y la supervivencia de fibroblastos cardiacos¹⁹⁸. Por otro lado, el colágeno XVI se expresa en gran variedad de tejidos y se cree que actúa como enlazador de proteínas ayudando a organizar las grandes redes fibrilares que modulan la integridad y la estabilidad de la MEC¹⁹⁹. Además, un estudio reciente relaciona su acumulación con el proceso inflamatorio que tiene lugar en la enfermedad de Crohn. En el modelo propuesto, el aumento de la expresión de colágeno XVI promovería eficazmente la formación y maduración de adhesiones focales en miofibroblastos subepiteliales intestinales. Ello retendría los miofibroblastos en el sitio de inflamación, promoviendo respuestas

fibróticas en el tejido y prolongando la alteración de la homeostasis celular y extracelular²⁰⁰.

En respuesta a señales de estrés como es una lesión tisular, los fibroblastos expresan α -SMA que se organiza en miofilamentos contráctiles. De esta manera los fibroblastos se diferencian a sus formas especializadas o “activas” conocidas como miofibroblastos, que migran a la zona dañada donde sintetizan elevadas cantidades de proteínas de la MEC típicas del tejido cicatrizal. A diferencia de una lesión normal donde los miofibroblastos son eliminados por apoptosis tras la cicatrización de la lesión, en la enfermedad fibrótica se produce la persistencia de los miofibroblastos en el área de la lesión, lo que resulta en depósito de colágeno en exceso^{201, 202}. En concordancia, sugerimos que la alteración en la expresión de los colágenos XIV y XVI podría facilitar la supervivencia de los miofibroblastos y promover su retención en la zona de inflamación cardíaca, dando lugar a un proceso de fibrosis de reemplazo persistente y en consecuencia a la remodelación patológica.

Adicionalmente a la sobre-expresión de estos colágenos, encontramos que los niveles de ARNm de *COL4A5* se relacionaban de manera inversa y significativa con la FA, y que los niveles de ARNm de *COL16A1* se correlacionaron de manera directa y significativa con ambos diámetros DTSVI y DTDVI, lo que sugiere una vinculación entre la expresión del *COL4A5* y *COL16A1* con la disfunción del VI.

En cuanto al mecanismo de diferenciación y persistencia de los miofibroblastos en la zona de lesión propuesto, TGF- β participaría de

forma directa en la señalización de estos procesos²⁰². Aunque los niveles de ARNm de *TGF-β1* no estaban significativamente aumentados en nuestros pacientes con MCI, si lo estaban las formas *TGF-β2* y *TGF-β3*. Además, observamos una relación significativa y directa entre los niveles de *COL14A1* y *TGF-β2*. En este mismo sentido, *COL14A1* correlacionó de forma directa y significativa con *COL1A1*, *COL1A2* y *COL3A1*, lo que apoyaría la vinculación de este colágeno con el proceso de fibrosis cardiaca. De igual manera, *COL4A5* se relacionó de forma directa y significativa con estos mismos marcadores del proceso fibrótico.

El aumento de expresión de *COL4A5*, *COL14A1* y *COL16A1* fue confirmado mediante *RT-qPCR* y demostrado a nivel proteico. Aunque no se observaron correlaciones significativas entre *COL16A1* y los marcadores de fibrosis estudiados, encontramos correlaciones directas y significativas entre *COL16A1* con ambos colágenos *COL4A5* y *COL14A1*, lo que podría apuntar a una acción conjunta de estas moléculas en un mismo proceso.

Basándonos en nuestros hallazgos, hipotetizamos que estos colágenos no fibrilares hasta ahora no descritos en la IC humana, pueden tener funciones relevantes en el proceso de remodelado, regulando la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos, la migración, supervivencia y persistencia de los miofibroblastos en el área dañada, y ayudando en la organización de fibras heterotípicas con otros colágenos como los tipos I y III. Todos estos procesos conjuntamente facilitarían

el desarrollo de fibrosis cardiaca y, en consecuencia, el desarrollo de remodelado y disfunción ventricular.

La importancia de nuevos descubrimientos en este campo se pone de manifiesto a través de estudios previos que han demostrado que la inhibición del remodelado producido por los depósitos de colágeno puede conducir a la mejora de la función cardiaca^{146, 203}. Nuestros resultados sugieren nuevos objetivos para futuros estudios de este complejo proceso que tiene lugar en pacientes con MCI.

2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

En la MCD, el remodelado se caracteriza por el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos, por proliferación y migración celular, fibrosis cardíaca y por muerte celular necrótica y apoptótica. El aumento de la fibrosis y del metabolismo del colágeno en el miocardio conduce a rigidez ventricular y debilitamiento de las uniones estructurales, lo cual va acompañado de la progresión de la dilatación cardíaca y disfunción del VI^{61, 62}.

Numerosas investigaciones se están llevando a cabo para dilucidar el papel que las diversas y versátiles proteínas de colágeno pueden jugar en la fibrosis y en la progresión de las miocardiopatías. Nuestros estudios previos en la MCI sugirieron nuevas posibles funciones de los genes que codifican colágenos no fibrilares, hasta ahora no descritos en el proceso de remodelado cardíaco que tiene lugar en la IC humana²⁰⁴. Considerando su participación en la MCI, quisimos identificar patrones de expresión alterados de estos genes en pacientes con MCD, e investigar cómo su expresión podría estar relacionada con una función cardíaca disminuida.

Tras una lesión celular y durante el desarrollo de aterosclerosis, la síntesis de colágeno tipo VIII aumenta significativamente para dar soporte a la migración celular y a la unión y adhesión de las células vasculares lisas (CVL), entre otras funciones^{205, 206}. En la migración celular, es necesario que las células se anclen y desanclen de la matriz para permitir su movimiento a través de ella. Este proceso está

coordinado por MMPs que degradan componentes de la MEC, permitiendo así la translocación celular²⁰⁷. El colágeno de tipo VIII es capaz de estimular la síntesis de MMP-2 y de MMP-9 en CVL^{205, 208, 209}, y existen estudios en ratones donde se demuestra que la supresión de este colágeno resulta en la alteración de la migración de las CVL y la disminución en la deposición de colágeno tipo I²¹⁰.

Por otra parte, la sobre-expresión de colágeno tipo VIII puede inducir hipertrofia y apoptosis en células mesangiales a través de la modulación de TGF- β 1²¹¹. En presencia de este colágeno, TGF- β 1 induce inhibidores del ciclo celular, produciendo la detención de las células mesangiales en fase G1, lo que está asociado con el desarrollo de hipertrofia²¹²⁻²¹⁴. Sin embargo, en la ausencia de expresión del colágeno tipo VIII, TGF- β 1 provoca la progresión del ciclo celular. Además, en células col8a1^{-/-}/col8a2^{-/-}, se observa de manera significativa una reducción de la apoptosis frente a células mesangiales normales, lo que confirma que en ausencia de la expresión de colágeno VIII, el TGF- β 1 es capaz de inducir vías de supervivencia en las células²¹¹. Este efecto del colágeno tipo VIII como inductor de la apoptosis también se ha descrito en las células endoteliales aórticas bovinas²¹⁵.

Como se ha mencionado anteriormente, el colágeno XVI se ha identificado como un posible promotor de la respuesta fibrótica. En estudios previos se propone que el colágeno XVI puede promover la formación y maduración de adhesiones focales en miofibroblastos, aumentando así el mantenimiento patológico de estas células en el área

de inflamación, prolongando la alteración de la homeostasis celular y de la MEC, y promoviendo el desarrollo de fibrosis en el tejido²⁰⁰.

En nuestro estudio, utilizando la técnica de secuenciación de ARN, identificamos niveles aumentados de ARNm de ambos genes *COL8A1* y *COL16A1*. Los niveles de expresión diferencial de ARNm de estos genes fueron validados por *RT-qPCR*. Adicionalmente, el análisis por *western blot* mostró en concordancia un aumento en los niveles proteicos, lo que refuerza la relevancia de estos genes en esta enfermedad. Los valores proteicos de COL8A1 y COL16A1 se relacionaron de forma directa y significativa, apoyando una posible acción conjunta de estos colágenos no fibrilares. También encontramos en nuestro grupo de pacientes con MCD, un aumento en los niveles de TGF- β 1 y la MMP-2, estando el factor TGF- β 1 significativamente sobre-expresado y relacionado con los niveles proteicos de COL8A1 y COL16A1, lo que respaldaría la implicación del TGF- β 1 en la modulación de la respuesta de los colágenos no fibrilares en la MCD. Además, se identificaron correlaciones directas y significativas entre *COL8A1* y establecidos marcadores moleculares del proceso apoptótico y fibrótico, apoyando su potencial participación en estos procesos. Por otra parte, encontramos otros genes miocárdicos de colágenos no fibrilares cuya sobre-expresión en pacientes con MCD era desconocida hasta ahora, como son los colágenos *COL4A5*, *COL9A1*, *COL21A1* y *COL23A1*.

El colágeno XXIII, es un colágeno transmembrana que puede encontrarse en su forma completa anclado a la membrana o en forma

soluble como ectodominio. El procesamiento proteolítico de esta proteína y liberación del ectodominio ha sido relacionado con la activación de factores de crecimiento y cascadas de proteasas, y se ha vinculado con un mecanismo de adaptación al medio tras una lesión mediante la inducción de la escisión del ectodominio del colágeno XXIII y posterior migración celular^{216, 217}.

Al igual que el colágeno XXIII, el colágeno tipo XXI tampoco había sido descrito en la MCD. El colágeno XXI pertenece a la clase FACIT, que incluye a miembros como los colágenos IX, XII, XIV y XVI. Estos colágenos pueden asociarse con colágenos fibrilares, como el tipo I y III, y tener un papel en su organización^{68, 218}. Por otro lado, es conocido que algunas formas de colágeno de tipo IV participan en el desarrollo de la fibrosis en corazones con MCD, probablemente induciendo la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos^{219, 220}.

Teniendo en cuenta lo anterior, sugerimos que los colágenos tipo VIII y XXIII sobre-expresados podrían facilitar la migración de las células cardíacas mediante la estimulación de la síntesis y actividad de las MMPs que permiten la liberación de las células de la matriz, y pueden conducir al debilitamiento estructural de la reticulación y al aumento de la distensibilidad ventricular. Como se ha mencionado previamente, la regulación positiva del colágeno VIII se asocia con aumento de la apoptosis y la hipertrofia. En relación, observamos que los niveles de ARNm de *COL8A1* se relacionaron significativamente de manera directa con el IMVI ($r = 0,653$; $P < 0,05$) y con marcadores del proceso apoptótico ($r = 0,735$; $P < 0,01$). Tal y como se ha referenciado

anteriormente, el desarrollo de hipertrofia *per se* también podría desencadenar apoptosis celular. Por todo ello, postulamos que el colágeno VIII podría inducir la hipertrofia y apoptosis de los cardiomiocitos en la MCD a través de la modulación del TGF- β . Las correlaciones directas de este colágeno con los marcadores de estos procesos y con el factor TGF- β 1 respaldaría esta teoría. Junto con el colágeno de tipo VIII, la sobre-expresión de los colágenos tipo IV y XVI podría estar facilitando la migración, diferenciación de fibroblastos y su retención en la zona de lesión cardíaca. Los colágenos IX y XXI, asimismo, podrían participar en el proceso fibrótico colaborando en la organización de los colágenos fibrilares. Las correlaciones directas observadas entre *COL4A5*, *COL9A1*, *COL16A1* y *COL21A1*, estarían de acuerdo con una acción conjunta de los colágenos no fibrilares. Además, es de destacar que el porcentaje de genes codificantes de colágenos no fibrilares alterados respecto del total de genes del colágeno expresados en esta cardiomiopatía, es tres veces mayor que el porcentaje de genes del colágeno fibrilares alterados, indicando la especial relevancia de la expresión de este grupo de colágenos no fibrilares en la MCD.

Por consiguiente, hipotetizamos que la sobre-expresión conjunta de determinados colágenos no fibrilares puede promover el remodelado patológico mediante la inducción de hipertrofia y apoptosis de cardiomiocitos, mediante la promoción de la migración y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y su persistencia en el

área de lesión, y a través de la facilitación de la organización de los colágenos fibrilares.

En definitiva, estos resultados proponen nuevas perspectivas para la patogénesis de la MCI y la MCD, etiologías destacadas de la IC, cuyo mecanismo fisiopatológico propondría a los hasta ahora desconocidos colágenos no fibrilares como actores elementales y destacados promotores de un proceso patológico de fibrosis, siendo esenciales en la organización y formación de la cicatriz fibrótica, así como de los procesos de hipertrofia y apoptosis, que consecuentemente dan lugar al desarrollo de remodelado cardíaco, causa subyacente de la IC. La alteración de su expresión podría ser el desencadenante de estos procesos, en cuya modulación de la respuesta parece tener un papel central el TGF- β , donde además del TGF- β 1, las formas TGF- β 2 y TGF- β 3 podrían estar implicadas en la señalización de estos mecanismos dada su sobre-expresión diferencial en ambas miocardiopatías.

Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan nuevas dianas para futuras investigaciones que permitan dilucidar la función de estos colágenos no fibrilares en la modulación de la fibrosis miocárdica, y la dilatación y apoptosis cardíaca, procesos complejos que subyacen al mecanismo de remodelado y que producen como resultado la disfunción cardíaca que sufren los pacientes con MCI y MCD. Nuevos conocimientos en este campo pueden ofrecer prometedoras opciones terapéuticas para un segmento de la población que aumenta de manera progresiva, como es el caso de las personas con insuficiencia cardíaca.



CONCLUSIONES

1. Utilizando la técnica de secuenciación de ARN comparamos los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas de colágeno en muestras de pacientes con miocardiopatía isquémica y miocardiopatía dilatada. Confirmamos la sobre-expresión de los colágenos fibrilares I, III, y V, e identificamos en ambas miocardiopatías la expresión de genes codificantes de colágenos no fibrilares previamente no asociados con la insuficiencia cardiaca.
2. En la miocardiopatía isquémica, se identificó un aumento de la expresión de los genes codificantes de colágenos no fibrilares *COL4A1*, *COL4A5*, *COL9A1*, *COL14A1* y *COL16A1*. La sobre-expresión de *COL16A1* y *COL4A5* se asoció con disfunción ventricular. De acuerdo a la expresión génica, los niveles proteicos de *COL4A5*, *COL14A1* y *COL16A1* estaban aumentados. La sobre-expresión de *COL14A1* se relacionó con marcadores de proliferación e hipertrofia. *COL4A5* y *COL14A1* se relacionaron de manera directa con marcadores del proceso de fibrosis. Además, observamos correlaciones entre los colágenos IV, XIV y XVI.
3. En la miocardiopatía dilatada, se identificó la sobre-expresión de los genes codificantes de colágenos no fibrilares *COL4A5*, *COL8A1*, *COL9A1*, *COL16A1*, *COL21A1* y *COL23A1*. Los niveles aumentados de *COL8A1* se asociaron con el índice de masa ventricular izquierdo. Observamos un incremento de los niveles proteicos de *COL8A1* y *COL16A1* en concordancia con la expresión génica. Además, identificamos un aumento de los niveles

proteicos de TGF- β 1 y MMP-2, aunque solo TGF- β 1 alcanzó la significación estadística. La sobre-expresión de TGF- β 1 se relacionó de forma directa con los niveles proteicos de COL8A1 y COL16A1. El aumento de expresión de los marcadores moleculares del proceso fibrótico y apoptótico correlacionó de forma directa con *COL8A1*. Además, encontramos que los colágenos IV, VIII, IX, XVI y XXI se relacionaron entre sí.



BIBLIOGRAFÍA

1. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* Aug 2012;14(8):803-869.
2. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* Oct 2008;10(10):933-989.
3. Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, et al. Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* Feb 2005;26(4):384-416.
4. Segovia Cubero J, Alonso-Pulpon Rivera L, Pereira Moral R, Silva Melchor L. [Heart failure: etiology and approach to diagnosis]. *Rev Esp Cardiol.* Mar 2004;57(3):250-259.
5. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of

- Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* Sep-Oct 1989;2(5):358-367.
6. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* Jun 2005;26(11):1115-1140.
 7. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol.* Dec 2001;38(7):2101-2113.
 8. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* Oct 15 2013;62(16):e147-239.
 9. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* Apr 13 2000;342(15):1077-1084.
 10. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for

- the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. Jan 10 2015;385(9963):117-171.
11. Bangdiwala SI, Weiner DH, Bourassa MG, Friesinger GC, 2nd, Ghali JK, Yusuf S. Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Registry: rationale, design, methods and description of baseline characteristics. *Am J Cardiol*. Aug 01 1992;70(3):347-353.
 12. Teerlink JR, Goldhaber SZ, Pfeffer MA. An overview of contemporary etiologies of congestive heart failure. *Am Heart J*. Jun 1991;121(6 Pt 1):1852-1853.
 13. Horowitz JD, Kennedy JA. Time to address the cardiac metabolic "triple whammy" ischemic heart failure in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*. Dec 05 2006;48(11):2232-2234.
 14. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. Mar 01 1996;93(5):841-842.
 15. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on

- Epidemiology and Prevention. *Circulation*. Apr 11 2006;113(14):1807-1816.
16. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. Jan 2008;29(2):270-276.
 17. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. Sep 27 1984;311(13):819-823.
 18. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. Jul 30 1998;339(5):321-328.
 19. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*. Feb 1998;19 Suppl B:B2-11.
 20. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. Jul 17 1992;257(5068):387-389.
 21. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. Jul 26 1990;323(4):236-241.
 22. Arad M, Freimark D. Predicting prognosis in dilated cardiomyopathy. *Isr Med Assoc J*. Nov 2012;14(11):687-689.
 23. Tunon T, Guerrero D, Urchaga A, et al. Danon disease: a novel Lamp-2 gene mutation in a family with four affected members. *Neuromuscul Disord*. Feb 2008;18(2):167-174.

24. Martin Jadraque L. [Myocardial infarct in young persons]. *Med Clin (Barc)*. Apr 09 1988;90(14):576-578.
25. Acquatella H. [Dilated cardiomyopathy: recent advances and current treatment]. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53 Suppl 1:19-27.
26. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*. Jan 1994;89(1):151-163.
27. Kapelko VI. Extracellular matrix alterations in cardiomyopathy: The possible crucial role in the dilative form. *Exp Clin Cardiol*. Spring 2001;6(1):41-49.
28. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*. Mar 2014;19(2):173-185.
29. Anversa P, Sonnenblick EH. Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis*. Jul-Aug 1990;33(1):49-70.
30. Kumar V. Radiolabeled white blood cells and direct targeting of micro-organisms for infection imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. Dec 2005;49(4):325-338.
31. Sanbe A. Dilated cardiomyopathy: a disease of the myocardium. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(1):18-22.
32. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. Dec 08 1994;331(23):1564-1575.
33. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of

- Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. Jul 14 2016;37(27):2129-2200.
34. Davie AP, Francis CM, Love MP, et al. Value of the electrocardiogram in identifying heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *BMJ*. Jan 27 1996;312(7025):222.
 35. Dhir M, Nagueh SF. Echocardiography and prognosis of heart failure. *Curr Opin Cardiol*. May 2002;17(3):253-256.
 36. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. [Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure: executive summary (update 2005)]. *Rev Esp Cardiol*. Sep 2005;58(9):1062-1092.
 37. Laribi S, Aouba A, Nikolaou M, et al. Trends in death attributed to heart failure over the past two decades in Europe. *Eur J Heart Fail*. Mar 2012;14(3):234-239.
 38. Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, McMurray JJ. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur J Heart Fail*. Jun 2002;4(3):361-371.
 39. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Oden A, Rosengren A. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital cases in Sweden (1988 to 2004). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. Nov 2010;3(6):573-580.

40. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* Jun 2001;3(3):315-322.
41. Armijo JA, Mediavilla A, Florez J. Inhibition of the activity of the respiratory and vasomotor centers by centrally administered 5-hydroxytryptamine in cats. *Rev Esp Fisiol.* Jun 1979;35(2):219-227.
42. Falzon D, Schunemann HJ, Harausz E, et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur Respir J.* Mar 2017;49(3).
43. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA.* Jan 08 2003;289(2):194-202.
44. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* Mar 1999;20(6):447-455.
45. Writing Group M, Lloyd-Jones D, Adams RJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* Feb 23 2010;121(7):e46-e215.

46. McMurray JJ, Petrie MC, Murdoch DR, Davie AP. Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur Heart J*. Dec 1998;19 Suppl P:P9-16.
47. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. Sep 2007;93(9):1137-1146.
48. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. Sep 2004;25(18):1614-1619.
49. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. Oct 31 2002;347(18):1397-1402.
50. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. Dec 10 2002;106(24):3068-3072.
51. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*. Jul 21 2004;292(3):344-350.
52. Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, et al. Congestive heart failure in the community: trends in incidence and survival in a 10-year period. *Arch Intern Med*. Jan 11 1999;159(1):29-34.
53. Godoy P, Castilla J, Mayoral JM, et al. Smoking may increase the risk of hospitalization due to influenza. *Eur J Public Health*. Oct 2016;26(5):882-887.

54. Braunstein JB, Anderson GF, Gerstenblith G, et al. Noncardiac comorbidity increases preventable hospitalizations and mortality among Medicare beneficiaries with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. Oct 01 2003;42(7):1226-1233.
55. Loefer LR, Rosamond WD, Chang PP, Folsom AR, Chambless LE. Heart failure incidence and survival (from the Atherosclerosis Risk in Communities study). *Am J Cardiol*. Apr 01 2008;101(7):1016-1022.
56. Raposeiras-Roubin S, Triant V. Ischemic Heart Disease in HIV: An In-depth Look at Cardiovascular Risk. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. Dec 2016;69(12):1204-1213.
57. Cantwell JD. Jean-Nicolas Corvisart. *Clin Cardiol*. Nov 1988;11(11):801-803.
58. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. Jun 1982;65(7):1446-1450.
59. Roberts CS, Maclean D, Maroko P, Kloner RA. Early and late remodeling of the left ventricle after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. Aug 1 1984;54(3):407-410.
60. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. Mar 1 2000;35(3):569-582.
61. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. Jan 1999;79(1):215-262.

- 62. Weber KT, Sun Y, Katwa LC. Local regulation of extracellular matrix structure. *Herz*. Apr 1995;20(2):81-88.
- 63. Dorn GW, 2nd. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. *Nat Rev Cardiol*. Apr 2009;6(4):283-291.
- 64. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. Aug 2008;58(2):88-111.
- 65. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. Jan 2002;53(1):31-47.
- 66. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. May 1 2007;74(2):184-195.
- 67. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*. Jul 23 2013;128(4):388-400.
- 68. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-958.
- 69. Brooks A, Schinde V, Bateman AC, Gallagher PJ. Interstitial fibrosis in the dilated non-ischaemic myocardium. *Heart*. Oct 2003;89(10):1255-1256.
- 70. Sun Y, Weber KT. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods Mol Med*. 2005;117:273-290.
- 71. Nicoletti A, Heudes D, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, Michel JB. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and

- temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* Dec 1996;32(6):1096-1107.
72. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.* Apr 2009;131(4):471-481.
73. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* Apr 1996;27(5):1201-1206.
74. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* May 2002;2(5):346-353.
75. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* Sep 1975;56(3):740-750.
76. Birdsall HH, Green DM, Trial J, et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation.* Feb 4 1997;95(3):684-692.
77. Pennington DW, Lopez AR, Thomas PS, Peck C, Gold WM. Dog mastocytoma cells produce transforming growth factor beta 1. *J Clin Invest.* Jul 1992;90(1):35-41.

78. Chancey AL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2002;282(6):H2152-2158.
79. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. Aug 18 1998;98(7):699-710.
80. Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor- α -induced cardiomyopathy. *Circulation*. Apr 20 2004;109(15):1892-1897.
81. Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor α -induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. Dec 15 1996;98(12):2854-2865.
82. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res*. Oct 1997;81(4):627-635.
83. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor- α provokes a

- hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*. Mar 4 1997;95(5):1247-1252.
- 84.** Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. Nov 1993;92(5):2303-2312.
- 85.** Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*. Aug 01 2002;55(2):329-340.
- 86.** Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. Jun 25 2004;94(12):1543-1553.
- 87.** Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. Jul 14 1998;98(2):149-156.
- 88.** Flesch M, Hoper A, Dell'Italia L, et al. Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*. Aug 5 2003;108(5):598-604.
- 89.** Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs*. Apr 2002;3(4):569-577.
- 90.** Sciarretta S, Paneni F, Palano F, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in

- the development and progression of diastolic dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. Mar 2009;116(6):467-477.
91. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. Feb 2014;71(4):549-574.
92. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. Oct 9 2003;425(6958):577-584.
93. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. Jan 2009;19(1):128-139.
94. Werner F, Jain MK, Feinberg MW, et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*. Nov 24 2000;275(47):36653-36658.
95. Hautmann MB, Adam PJ, Owens GK. Similarities and differences in smooth muscle alpha-actin induction by TGF-beta in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Sep 1999;19(9):2049-2058.
96. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*. Aug 1990;63(2):144-161.
97. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. May 2006;118(1):10-24.

98. Ferrari R, Ceconi C, Campo G, et al. Mechanisms of remodelling: a question of life (stem cell production) and death (myocyte apoptosis). *Circ J*. Nov 2009;73(11):1973-1982.
99. Wu Y, Tobias AH, Bell K, et al. Cellular and molecular mechanisms of systolic and diastolic dysfunction in an avian model of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2004;37(1):111-119.
100. Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem*. Jun 7-21 1995;147(1-2):29-34.
101. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging*. Jan 2011;4(1):98-108.
102. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res*. Apr 1994;74(4):727-739.
103. Ohta K, Kim S, Wanibuchi H, Ganten D, Iwao H. Contribution of local renin-angiotensin system to cardiac hypertrophy, phenotypic modulation, and remodeling in TGR (mRen2)27 transgenic rats. *Circulation*. Aug 15 1996;94(4):785-791.
104. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 1997;29(7):1947-1958.
105. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and

- hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. Sep 1993;73(3):413-423.
- 106.** Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest*. Mar 2002;109(6):787-796.
- 107.** Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*. May 1 2007;74(2):207-212.
- 108.** Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-161.
- 109.** Roberts AB, Sporn MB. Mechanistic interrelationships between two superfamilies: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor-beta. *Cancer Surv*. 1992;14:205-220.
- 110.** Agrotis A, Kalinina N, Bobik A. Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders. *Curr Vasc Pharmacol*. Jan 2005;3(1):55-61.
- 111.** Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol*. Apr 1990;110(4):1361-1367.
- 112.** Hayashi H, Sakai T. Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases. *Front Physiol*. 2012;3:12.
- 113.** Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. Jun 13 2003;113(6):685-700.
- 114.** Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P. Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical

- determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* Mar 29 2006;7:16.
- 115.** Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* Dec 2001;114(Pt 24):4359-4369.
- 116.** Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* Oct 9 1997;389(6651):631-635.
- 117.** Wang B, Hao J, Jones SC, Yee MS, Roth JC, Dixon IM. Decreased Smad 7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2002;282(5):H1685-1696.
- 118.** Gao X, He X, Luo B, Peng L, Lin J, Zuo Z. Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* Mar 15 2009;606(1-3):115-120.
- 119.** Matsumoto-Ida M, Takimoto Y, Aoyama T, Akao M, Takeda T, Kita T. Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 2006;290(2):H709-715.
- 120.** Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY. Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension.* Oct 2009;54(4):877-884.

- 121. Edlund S, Bu S, Schuster N, et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell*. Feb 2003;14(2):529-544.
- 122. Levine RA, Hagege AA, Judge DP, et al. Mitral valve disease--morphology and mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. Dec 2015;12(12):689-710.
- 123. Uozumi H, Hiroi Y, Zou Y, et al. gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. Jun 22 2001;276(25):23115-23119.
- 124. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med*. Oct 2000;10(7):298-303.
- 125. Damilano F, Franco I, Perrino C, et al. Distinct effects of leukocyte and cardiac phosphoinositide 3-kinase gamma activity in pressure overload-induced cardiac failure. *Circulation*. Feb 01 2011;123(4):391-399.
- 126. Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J*. Jan 11 2006;25(1):58-69.
- 127. Ma Y, Halade GV, Lindsey ML. Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. Dec 2012;5(6):848-857.

- 128. Medugorac I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol.* Nov-Dec 1982;77(6):589-598.
- 129. Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, Heymans S. Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ Res.* Feb 28 2014;114(5):872-888.
- 130. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jan 2011;3(1):a004978.
- 131. Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci (Landmark Ed).* Jan 01 2011;16:674-697.
- 132. Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem.* Feb 11 2005;280(6):4005-4008.
- 133. Bella J, Hulmes DJ. Fibrillar Collagens. *Subcell Biochem.* 2017;82:457-490.
- 134. Alberts B. Cell biology: the endless frontier. *Mol Biol Cell.* Nov 15 2010;21(22):3785.
- 135. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* Jan 2004;20(1):33-43.
- 136. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* Feb 15 2005;386(Pt 1):15-27.
- 137. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods.* May 2008;45(1):65-74.

- 138. Avery NC, Bailey AJ. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol (Paris)*. Sep 2006;54(7):387-395.
- 139. Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci*. May 1991;16(5):191-194.
- 140. Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG. Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem*. Aug 23 2002;277(34):31142-31153.
- 141. Ricard-Blum S, Ville G. Collagen cross-linking. *Int J Biochem*. 1989;21(11):1185-1189.
- 142. Tu H, Huhtala P, Lee HM, Adams JC, Pihlajaniemi T. Membrane-associated collagens with interrupted triple-helices (MACITs): evolution from a bilaterian common ancestor and functional conservation in *C. elegans*. *BMC Evol Biol*. Dec 14 2015;15:281.
- 143. Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruckner-Tuderman L, Hansen U, Bruckner P. Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem*. Sep 05 2008;283(36):24506-24513.
- 144. Borza DB, Bondar O, Ninomiya Y, et al. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *J Biol Chem*. Jul 27 2001;276(30):28532-28540.

145. Kassner A, Hansen U, Miosge N, et al. Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* Apr 2003;22(2):131-143.
146. Diez J, Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation.* May 28 2002;105(21):2512-2517.
147. Burlew BS, Weber KT. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin.* Aug 2000;18(3):435-442.
148. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF, Jr. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol.* May 1996;148(5):1639-1648.
149. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol.* Mar-Apr 2005;14(2):49-60.
150. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res.* Mar 09 1998;82(4):482-495.
151. Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, et al. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by

- TGF-beta1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res.* Jul 01 2004;63(1):87-97.
- 152.** Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation.* Mar 17 2015;131(11):1019-1030.
- 153.** Kamo T, Akazawa H, Komuro I. Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* Jun 19 2015;117(1):89-98.
- 154.** Azhar M, Schultz Jel J, Grupp I, et al. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct 2003;14(5):391-407.
- 155.** Cartledge JE, Kane C, Dias P, et al. Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc Res.* Mar 01 2015;105(3):260-270.
- 156.** Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Jr., Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest.* Oct 1994;94(4):1470-1476.
- 157.** Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* Jan 2007;292(1):C82-97.
- 158.** Watkins SJ, Jonker L, Arthur HM. A direct interaction between TGFbeta activated kinase 1 and the TGFbeta type II receptor: implications for TGFbeta signalling and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* Feb 01 2006;69(2):432-439.

159. Distefano G, Sciacca P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr.* Sep 12 2012;38:41.
160. Diez J. [Apoptosis in cardiovascular diseases]. *Rev Esp Cardiol.* Feb 2000;53(2):267-274.
161. Dorn GW, 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2009;81(3):465-473.
162. Creagh EM. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends Immunol.* Nov 10 2014;35(12):631-640.
163. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* Jul 2009;16(7):935-938.
164. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* Apr 21 1997;185(8):1481-1486.
165. Narula J, Arbustini E, Chandrashekhara Y, Schwaiger M. Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol Clin.* Feb 2001;19(1):113-126.
166. Teiger E, Than VD, Richard L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* Jun 15 1996;97(12):2891-2897.

- 167. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* May 2003;111(10):1497-1504.
- 168. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* Apr 1992;72(2):369-417.
- 169. Vatner SF. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *Am J Cardiol.* Sep 09 1988;62(8):94E-98E.
- 170. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* Jul 2012;33(14):1787-1847.
- 171. Macrae DJ. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc.* May 2007;4(2):176-178, discussion 178-179.
- 172. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet.* Feb 2011;12(2):87-98.
- 173. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* Jan 2009;10(1):57-63.
- 174. Li H, Handsaker B, Wysocker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* Aug 15 2009;25(16):2078-2079.

175. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* May 2010;28(5):511-515.
176. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* Jan 15 2015;31(2):166-169.
177. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* Jan 1 2010;26(1):139-140.
178. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* Jan 01 2002;30(1):207-210.
179. Fernandez de Las Heras L, Mascaraque V, Garcia Fernandez E, Navarro-Llorens JM, Perera J, Drzyzga O. ChoG is the main inducible extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus* sp. strain CECT3014. *Microbiol Res.* Jul 20 2011;166(5):403-418.
180. Arikawa E, Sun Y, Wang J, et al. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics.* Jul 11 2008;9:328.
181. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec 2001;25(4):402-408.

- 182.** Winters AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem.* Nov 1 2005;346(1):43-48.
- 183.** Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1979;76(9):4350-4354.
- 184.** Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Freisler J. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem.* May 1966;9(3):447.
- 185.** Dunlay SM, Pereira NL, Kushwaha SS. Contemporary Strategies in the Diagnosis and Management of Heart Failure. *Mayo Clin Proc.* Mar 29 2014.
- 186.** Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* Aug 1995;147(2):325-338.
- 187.** Shamhart PE, Meszaros JG. Non-fibrillar collagens: key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *J Mol Cell Cardiol.* Mar 2010;48(3):530-537.
- 188.** Yamanishi A, Kusachi S, Nakahama M, et al. Sequential changes in the localization of the type IV collagen alpha chain in the infarct zone: immunohistochemical study of experimental myocardial infarction in the rat. *Pathol Res Pract.* 1998;194(6):413-422.

189. Ooshima A. Collagen alpha B chain: increased proportion in human atherosclerosis. *Science*. Aug 7 1981;213(4508):666-668.
190. Yoshikane H, Honda M, Goto Y, Morioka S, Ooshima A, Moriyama K. Collagen in dilated cardiomyopathy--scanning electron microscopic and immunohistochemical observations. *Jpn Circ J*. Sep 1992;56(9):899-910.
191. Lincoln J, Florer JB, Deutsch GH, Wenstrup RJ, Yutzey KE. ColVa1 and ColXIa1 are required for myocardial morphogenesis and heart valve development. *Dev Dyn*. Dec 2006;235(12):3295-3305.
192. Eghbali M, Weber KT. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem*. Jul 17 1990;96(1):1-14.
193. Young BB, Gordon MK, Birk DE. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev Dyn*. Apr 2000;217(4):430-439.
194. Bruckner P, Mendler M, Steinmann B, Huber S, Winterhalter KH. The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J Biol Chem*. Nov 15 1988;263(32):16911-16917.
195. Liu CY, Olsen BR, Kao WW. Developmental patterns of two alpha 1(IX) collagen mRNA isoforms in mouse. *Dev Dyn*. Oct 1993;198(2):150-157.

- 196.** Di Salvo TG, Guo Y, Su YR, et al. Right ventricular long noncoding RNA expression in human heart failure. *Pulm Circ.* Mar 2015;5(1):135-161.
- 197.** Fokin AA, Steuerwald NM, Ahrens WA, Allen KE. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* Spring 2009;21(1):44-57.
- 198.** Tao G, Levay AK, Peacock JD, et al. Collagen XIV is important for growth and structural integrity of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Nov 2012;53(5):626-638.
- 199.** Grassel S, Bauer RJ. Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biol.* Mar 11 2013;32(2):64-73.
- 200.** Ratzinger S, Eble JA, Pasoldt A, et al. Collagen XVI induces formation of focal contacts on intestinal myofibroblasts isolated from the normal and inflamed intestinal tract. *Matrix Biol.* Apr 2010;29(3):177-193.
- 201.** Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* Jul 2003;200(4):500-503.
- 202.** Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* Jun 2007;170(6):1807-1816.
- 203.** Palaniyandi SS, Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D. PKC β II inhibition attenuates myocardial infarction induced heart failure and is associated with a reduction of fibrosis and pro-inflammatory responses. *J Cell Mol Med.* Aug 2011;15(8):1769-1777.

- 204.** Gil-Cayuela C, Rivera M, Ortega A, et al. RNA sequencing analysis identifies new human collagen genes involved in cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* Mar 31 2015;65(12):1265-1267.
- 205.** Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am J Pathol.* Feb 2000;156(2):467-476.
- 206.** Sibinga NE, Foster LC, Hsieh CM, et al. Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ Res.* Apr 1997;80(4):532-541.
- 207.** Basbaum CB, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* Oct 1996;8(5):731-738.
- 208.** Johnson C, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jan 2004;24(1):54-60.
- 209.** Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Itohara S, Iguchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* May 2006;26(5):1120-1125.
- 210.** Lopes J, Adiguzel E, Gu S, et al. Type VIII collagen mediates vessel wall remodeling after arterial injury and fibrous cap formation in atherosclerosis. *Am J Pathol.* Jun 2013;182(6):2241-2253.

- 211. Loeffler I, Hopfer U, Koczan D, Wolf G. Type VIII collagen modulates TGF-beta1-induced proliferation of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* Apr 2011;22(4):649-663.
- 212. Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ. The hypertrophic effect of transforming growth factor-beta is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27. *J Am Soc Nephrol.* May 2002;13(5):1172-1178.
- 213. Wolf G, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ. High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27(Kip1), an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol.* Mar 2001;158(3):1091-1100.
- 214. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* Aug 1999;56(2):393-405.
- 215. Xu R, Yao ZY, Xin L, Zhang Q, Li TP, Gan RB. NC1 domain of human type VIII collagen (alpha 1) inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 23 2001;289(1):264-268.
- 216. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* Apr 4 1997;276(5309):75-81.
- 217. Veit G, Zimina EP, Franzke CW, et al. Shedding of collagen XXIII is mediated by furin and depends on the plasma membrane microenvironment. *J Biol Chem.* Sep 14 2007;282(37):27424-27435.
- 218. Fitzgerald J, Bateman JF. A new FACIT of the collagen family: COL21A1. *FEBS Lett.* Sep 14 2001;505(2):275-280.

- 219.** Orr AW, Lee MY, Lemmon JA, et al. Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2009;29(2):225-231.
- 220.** Watanabe T, Kusachi S, Yamanishi A, et al. Localization of type IV collagen alpha chain in the myocardium of dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Heart J.* Nov 1998;39(6):753-762.



PUBLICACIONES

PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTA TESIS DOCTORAL

- **Gil-Cayuela C**, Rivera M, Ortega A, Tarazón E, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Almenar L, Martínez-Dolz L, Portolés M. RNA sequencing analysis identifies new human collagen genes involved in cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 31;65(12):1265-1267. doi: 10.1016/j.jacc.2015.01.029.

- **Gil-Cayuela C**, Roselló-Lletí E, Ortega A, Tarazón E, Triviño JC, Martínez-Dolz L, González-Juanatey JR, Lago F, Portolés M, Rivera M. New Altered Non-Fibrillar Collagens in Human Dilated Cardiomyopathy: Role in the Remodeling Process. *PLoS One*. 2016 Dec 9;11(12):e0168130. doi: 10.1371/journal.pone.0168130.

OTRAS PUBLICACIONES ORIGINADAS DURANTE EL PERÍODO DE ELABORACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

- **Gil-Cayuela C**, Ortega A, Tarazón E, Martínez-Dolz L, Cinca J, González-Juanatey JR, Lago F, Roselló-Lletí E, Rivera M, Portolés M. Myocardium of Patients with Dilated Cardiomyopathy Presents Altered Expression of Genes Involved in Thyroid Hormone Biosynthesis. *PLoS One*. 2018 Jan 10;13(1):e0190987. doi: 10.1371/journal.pone.0190987.

- **Gil-Cayuela C**, Roselló-Lletí E, Tarazón E, Ortega A, Sandoval J, Martínez-Dolz L, Cinca J, González-Juanatey JR, Lago F, Portolés M, Rivera M. Thyroid hormone biosynthesis machinery is altered in the ischemic myocardium: An epigenomic study. *Int J Cardiol*. 2017 Sep 15;243:27-33. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.05.042.

- Ortega A*, **Gil-Cayuela C***, Tarazón E, García-Manzanares M, Montero JA, Cinca J, Portolés M, Rivera M, Roselló-Lletí E. New Cell Adhesion Molecules in Human Ischemic Cardiomyopathy. PCDHGA3 Implications in Decreased Stroke Volume and Ventricular Dysfunction. *PLoS One*. 2016 Jul 29;11(7):e0160168. doi: 10.1371/journal.pone.0160168.

- Tarazón E*, Ortega A*, **Gil-Cayuela C**, Sánchez-Lacuesta E, Marín P, Lago F, González-Juanatey JR, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M, Roselló-Lletí E. SERCA2a: A potential non-invasive

biomarker of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Dec;36(12):1322-1328. doi: 10.1016/j.healun.2017.07.003.

- Ortega A*, Tarazón E*, **Gil-Cayuela C**, García-Manzanares M, Martínez-Dolz L, Lago F, González-Juanatey JR, Cinca J, Jorge E, Portolés M, Roselló-Lletí E, Rivera M. Intercalated disc in failing hearts from patients with dilated cardiomyopathy: Its role in the depressed left ventricular function. *PLoS One*. 2017 Sep 21;12(9):e0185062. doi: 10.1371/journal.pone.0185062.
- Ortega A*, Tarazón E*, **Gil-Cayuela C**, Martínez-Dolz L, Lago F, Sandoval J, Portolés M, Roselló-Lletí E, Rivera M. ASB1 differential methylation in ischaemic cardiomyopathy: relationship with left ventricular performance in end-stage heart failure patients. *ESC Heart Fail*. 2018 Apr 17. doi: 10.1002/ehf2.12289.
- Tarazón E*, Roselló-Lletí E*, Ortega A, **Gil-Cayuela C**, González-Juanatey JR, Lago F, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. Changes in human Golgi apparatus reflect new left ventricular dimensions and function in dilated cardiomyopathy patients. *Eur J Heart Fail*. 2017 Feb;19(2):280-282. doi: 10.1002/ejhf.671.
- Roselló-Lletí E*, Tarazón E*, Ortega A, **Gil-Cayuela C**, Carnicer R, Lago F, González-Juanatey JR, Portolés M, Rivera M. Protein Inhibitor of NOS1 Plays a Central Role in the Regulation of NOS1

Activity in Human Dilated Hearts. *Sci Rep*. 2016 Aug 2;6:30902. doi: 10.1038/srep30902.

- Ortega A*, Tarazón E*, Roselló-Lletí E, **Gil-Cayuela C**, Lago F, González-Juanatey JR, Cinca J, Jorge E, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. Patients with Dilated Cardiomyopathy and Sustained Monomorphic Ventricular Tachycardia Show Up-Regulation of KCNN3 and KCNJ2 Genes and CACNG8-Linked Left Ventricular Dysfunction. *PLoS One*. 2015 Dec 28;10(12):e0145518. doi: 10.1371/journal.pone.0145518.

- Ortega A*, Roselló-Lletí E*, Tarazón E, **Gil-Cayuela C**, Lago F, González-Juanatey JR, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischaemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function. *ESC Heart Fail*. 2016 Sep;3(3):220-224. doi: 10.1002/ehf2.12085.

- Roselló-Lletí E, Carnicer R, Tarazón E, Ortega A, **Gil-Cayuela C**, Lago F, González-Juanatey JR, Portolés M, Rivera M. Human Ischemic Cardiomyopathy Shows Cardiac Nos1 Translocation and its Increased Levels are Related to Left Ventricular Performance. *Sci Rep*. 2016 Apr 4;6:24060. doi: 10.1038/srep24060.